

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Interna



TESIS DOCTORAL

Aportación de los parámetros de laboratorio proporcionados por
el analizador hematológico Advia 2120 al diagnóstico de
hemoglobinopatías

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Diego Velasco Rodríguez

Director

Fernando Ataúlfo González Fernández

Madrid, 2017

© **Diego Velasco Rodríguez, 2016**

Universidad Complutense

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina Interna

TESIS DOCTORAL

Aportación de los parámetros de laboratorio proporcionados por el analizador hematológico Advia 2120 al diagnóstico de hemoglobinopatías



Dirigida por Fernando Ataúlfo González Fernández

Presentada por Diego Velasco Rodríguez

Madrid, 2016

El Dr. Fernando Ataúlfo González Fernández, profesor asociado del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA: Que el trabajo titulado “Aportación de los parámetros de laboratorio proporcionados por el analizador hematológico Advia 2120 al diagnóstico de hemoglobinopatías” ha sido realizado bajo su dirección en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Clínico San Carlos de Madrid por D. Diego Velasco Rodríguez, licenciado en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, para optar al GRADO DE DOCTOR por la misma universidad.

Madrid, 8 de abril de 2016.

Fernando Ataúlfo González Fernández

A mi madre, a María y a quien está a punto de llegar.

AGRADECIMIENTOS

A Ata, por descubrirme el apasionante mundo de la eritropatología, por ser un ejemplo como hematólogo y persona, y por poner toda su sabiduría al dirigir esta tesis.

A Carlos Grande, por haber aceptado ser mi tutor en este largo camino y por su inestimable ayuda en varios momentos.

A Juanma, por todos estos años juntos, por los grandes momentos en el trabajo y fuera de él, por ser mi estadístico de cabecera y mi pareja de hecho hematológica. Eres grande.

A los técnicos de Hematología del Laboratorio Central (Eli, Javi, Cris, Sara, Rosa, Esther, Bea, Martina, Erika), por haberme aguantado todos estos años y porque gracias a vosotros he conseguido gran parte de las muestras empleadas en mis estudios.

A Marta, María, Lorena y Natalia, compañeras y amigas, por vuestro apoyo y por poner vuestro granito de arena en distintos momentos durante estos años.

A Jesús Villarrubia, por tu amistad, porque contigo he aprendido hematimetría y citología y que ambas no son nada la una sin la otra, por haberme fichado para el Laboratorio Central de la Comunidad de Madrid, y por haberme apadrinado en tantos proyectos de trabajo.

A Fernando Cava, por tu plena disponibilidad y tu labor facilitadora, gracias a las cuales he podido continuar con mi trabajo de investigación a pesar de haberme embarcado en otro proyecto laboral. Ha sido un placer trabajar contigo, y espero que podamos seguir compartiendo proyectos.

A Paloma, Jorge y Félix, por vuestra inestimable contribución a este proyecto poniéndole nombre a los casos más difíciles de diagnosticar.

A Alfonso Muriel, por ayudarme con el diseño y con parte del estudio estadístico en uno de los artículos.

A todo el personal de Salud Laboral del Hospital Ramón y Cajal, especialmente a sus enfermeras. Habéis hecho mucho más de lo que os pedí y, gracias a vuestra ayuda, la investigación ha podido realizarse en los plazos previstos.

Al personal del Banco de Sangre del Hospital Ramón y Cajal que me ayudó a recoger muestras. Gracias.

A mi familia.

A mi padre, por estar siempre ahí y ser siempre un ejemplo.

A María, por todo.

Esta tesis doctoral corresponde a la modalidad de compendio de publicaciones, incluyendo los tres trabajos siguientes:

- ***“Delta-Beta Thalassaemia Trait: How can we discriminate it from Beta***

Thalassaemia Trait and Iron Deficiency Anemia?”. Velasco-Rodríguez D, Alonso-

Domínguez JM, González-Fernández FA, Villarrubia J, Ropero P, Martínez-Nieto J, de la Fuente-Gonzalo F, Guillén R, Natalia Acedo, Serí C, Cava F.

American Journal of Clinical Pathology. 2014 Oct; 142 (4): 567-73.

- ***“Reticulocyte Parameters of Delta Beta Thalassaemia Trait, Beta Thalassaemia***

Trait and Iron Deficiency Anemia”. Velasco-Rodríguez D, Alonso-Domínguez JM,

González-Fernández FA, Sopeña M, Abalo L, Villarrubia J, Ropero P, Martínez-Nieto J, de la Fuente-Gonzalo F, Cava F.

Journal of Clinical Pathology. 2016 Feb; 69: 149-154.

- ***“Laboratory parameters provided by Advia 2120 analyser identify structural***

haemoglobinopathy carriers and discriminate between Hb S trait and Hb C trait”.

Velasco-Rodríguez D, Alonso-Domínguez JM, González-Fernández FA, Muriel A, Abalo L,

Sopeña M, Villarrubia J, Ropero P, Plaza MP, Tenorio M, Jiménez-Martín A, Moreno G,

Martínez-Nieto J, de la Fuente-Gonzalo F, Fernández-Escribano M, López-Jiménez FJ,

Cava F.

Journal of Clinical Pathology. 2016 Feb 25. pii: jclinpath-2015-203556. doi:

10.1136/jclinpath-2015-203556.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	6
RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	21
ABREVIATURAS.....	25
INTRODUCCIÓN.....	29
1. HEMOGLOBINA.....	30
1.1. Concepto.....	30
1.2. Estructura de la hemoglobina.....	30
1.3. Funciones de la hemoglobina.....	31
1.4. Síntesis de globina.....	33
1.5. Ensamblaje de las subunidades de hemoglobina.....	35
1.6. Hemoglobinas embrionarias.....	37
1.7. Hemoglobinas normales del recién nacido y del adulto.....	38
1.8. Ontogenia de la hemoglobina humana.....	41
2. ENFERMEDADES DE LA HEMOGLOBINA.....	44
2.1. Talasemias.....	46
2.1.1. Fisiopatología.....	48
2.1.2. Alteraciones moleculares de las talasemias.....	50
2.1.2.1. Beta talasemia.....	50
2.1.2.2. Alfa talasemia.....	54
2.1.2.3. Delta-beta talasemia.....	56
2.1.3. Epidemiología de las talasemias.....	56

2.1.3.1. Prevalencia de la β -talasemia en España.....	57
2.1.3.2. Prevalencia de la α -talasemia en España.....	59
2.2. Hemoglobinopatías estructurales.....	61
2.2.1. Clasificación.....	62
2.2.2. Hemoglobinopatías estructurales comunes.....	63
2.2.2.1. Hemoglobina S.....	63
2.2.2.2. Hemoglobina C.....	65
2.2.2.3. Hemoglobina D.....	66
2.2.2.4. Hemoglobina E.....	67
2.2.2.5. Hemoglobina O-Arab.....	67
2.2.3. Prevalencia de hemoglobinopatías estructurales en España.....	68
3. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS.....	71
3.1. Niveles diagnósticos de hemoglobinopatías.....	71
3.2. Hemograma.....	74
3.3. Frotis de sangre periférica.....	76
3.4. Electroforesis de hemoglobinas.....	77
3.5. Isoelectroenfoque	79
3.6. HPLC.....	80
3.7. Electroforesis/isoelectroenfoque capilar.....	82
3.8. Otras técnicas.....	83
3.9. Técnicas moleculares.....	84
4. AVANCES DE LA HEMATIMETRÍA Y LOS ANALIZADORES HEMATOLÓGICOS RESPECTO AL ESTUDIO DE LA SERIE ROJA.....	86

5. PRINCIPALES APORTACIONES DE LA HEMATIMETRÍA AL DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATÍAS.....	88
5.1. Clasificación de las anemias en función de parámetros hematimétricos.....	88
5.2. Diagnóstico diferencial entre ferropenia y talasemia ante microcitosis.....	89
5.3. Hematimetría en la delta-beta talasemia heterocigota.....	91
5.4. Hematimetría en la alfa talasemia.....	91
5.5. Cambios en índices corpusculares de pacientes con hemoglobinopatía SS...92	
5.6. Diferencias entre individuos con hemoglobinopatías SS y SC.....	93
6. CARACTERÍSTICAS DEL AUTOANALIZADOR HEMATOLÓGICO ADVIA 2120 EN EL ANÁLISIS DE LA SERIE ROJA.....	93
6.1 Análisis de hematíes.....	94
6.2 Análisis de hemoglobina.....	98
6.3 Análisis de reticulocitos.....	98
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	103
ARTÍCULOS.....	107
1. Artículo número 1.....	109
2. Artículo número 2.....	117
3. Artículo número 3.....	125
DISCUSIÓN.....	135
CONCLUSIONES.....	181
BIBLIOGRAFÍA.....	185
ANEXO: Permisos de las revistas para utilizar los artículos en la tesis.....	209

RESUMEN

Las hemoglobinopatías constituyen las alteraciones monogénicas más frecuentes en el mundo. Se producen por mutaciones puntuales, deleciones o inserciones en los genes que codifican las cadenas de globina que pueden determinar una alteración cualitativa en la expresión de dichos genes (en el caso de las hemoglobinopatías estructurales) o una disminución o ausencia de la expresión de las cadenas de globina estructuralmente normales (en el caso de las talasemias).

Los flujos migratorios de las últimas décadas desde países subdesarrollados hacia países desarrollados han provocado cambios significativos en la distribución mundial de estas patologías. El problema no consiste únicamente en que su prevalencia haya aumentado de forma muy llamativa, sino que, en países desarrollados, el porcentaje de población portadora de al menos uno de estos defectos se espera que siga aumentando en las próximas décadas. En los países desarrollados, este aumento de prevalencia tan marcado hace que los programas de screening sean cada vez más necesarios.

La presente tesis doctoral tiene como objetivo general demostrar la utilidad de la hematimetría como herramienta en el diagnóstico de presunción de las hemoglobinopatías.

Como objetivos específicos, se ha querido profundizar en el estudio de la $\delta\beta$ -talasemia para intentar encontrar parámetros que discriminen entre esta patología y otras formas muy frecuentes de microcitosis como la β -talasemia y la ferropenia. Además de evaluar las diferencias en los hematíes maduros de estas tres entidades se han

analizado también las diferencias en sus parámetros reticulocitarios. Además, se han comparado 500 portadores de hemoglobinopatía estructural con 251 controles sanos con el objetivo, no sólo de estudiar las diferencias entre ambos grupos, sino de crear un modelo predictivo basado en estas diferencias que nos permita saber la probabilidad que tiene un individuo de ser portador de una variante de hemoglobina. Por último, y dado que las dos hemoglobinopatías más frecuentes en nuestro medio son la Hb S y la Hb C, se han analizado sus diferencias en los parámetros del hemograma y se han intentado explicar dichas diferencias a través de los cambios fisiopatológicos de estos trastornos.

Los portadores de $\delta\beta$ -talasemia presentaron valores superiores en VCM, HCM, CHCM y, especialmente, en ADE en comparación a los portadores de β -talasemia. El ADE fue el parámetro que mayor poder de discriminación presentó. En los portadores de $\delta\beta$ -talasemia, el aumento en la síntesis de cadenas gamma compensa en parte el déficit de síntesis de cadenas beta. Por ese motivo, la hemoglobinización de los precursores $\delta\beta$ parece estar ligeramente aumentada en comparación con los precursores β , lo que explica que tengan una CHCM mayor, y, consecuentemente, sufran un menor número de divisiones y tengan un VCM mayor que los portadores de β -talasemia. En cuanto a las diferencias en el ADE, aunque las razones se desconocen, se sabe que los precursores eritroides de la $\delta\beta$ -talasemia muestran una distribución heterogénea de la Hb F, lo cual da lugar a distintos tamaños celulares y por tanto a mayor anisocitosis. El coeficiente de Pearson demostró una muy buena correlación entre el porcentaje de Hb F y el ADE, lo que demuestra que el grado de anisocitosis de estos pacientes está muy relacionado con la cantidad de Hb F.

Al comparar los portadores de talasemia (β y $\delta\beta$) con los individuos deficientes en hierro, se observaron diferencias significativas en todos los parámetros.

En cuanto al estudio de reticulocitos en estos tres grupos de pacientes, se demostró que las diferencias observadas en los parámetros de laboratorio de los hematíes maduros se observan también en sus precursores más inmediatos, los reticulocitos. Los reticulocitos $\delta\beta$ -talasémicos, por el mencionado aumento de síntesis compensadora de cadena gamma, presentan un mayor tamaño y concentración de hemoglobina que los reticulocitos β -talasémicos. Se confirmó además la mayor anisocitosis de los reticulocitos $\delta\beta$ -talasémicos, aunque el grado de correlación entre la Hb F y el ADE de los reticulocitos fue menor que el observado en los hematíes maduros. En cuanto a los sujetos con ferropenia, presentaron un mayor porcentaje de reticulocitos inmaduros a pesar de tener un menor recuento absoluto de reticulocitos, lo que sugiere un mayor grado de eritropoyesis ineficaz en comparación con los portadores de talasemia.

Al comparar los hematíes de individuos portadores de hemoglobinopatía estructural frente a hematíes de sujetos sanos, se observaron diferencias significativas en todos los parámetros analizados, con la excepción de Hb y HDW. El hecho de tener asociada ferropenia y/o α -talasemia no influyó en estas diferencias, lo que pone de manifiesto que el tipo de cadena de β -globina influye en el fenotipo de los hematíes. En concreto, los hematíes de los portadores de hemoglobinopatía estructural fueron más pequeños, más densos y mostraban una mayor anisocitosis que los hematíes de controles sanos.

Con los 4 parámetros que demostraron mayor capacidad discriminadora entre portadores y controles (VCM, ADE, %MICRO y M/H), se desarrolló un modelo

predictivo diagnóstico, utilizando el punto de corte para cada uno de estos parámetros con la mejor combinación de sensibilidad y especificidad. Según esto, a cada una de las muestras (casos y controles) se le asignó una puntuación final desde 0 hasta 4, dependiendo de cuántos de los siguientes criterios cumplía: VCM menor de 88.4 fl, ADE mayor de 13.4%, %MICRO mayor de 0.8% o M/H mayor de 0.7%. Según nuestros resultados, una puntuación de 4, 3, 2, 1 ó 0, resultó en una probabilidad de ser portador de cualquier hemoglobinopatía estructural del 98.32%, 85.23%, 66.67%, 36.26% o 9.64% respectivamente. Según estos resultados, con una puntuación de 3-4 se debería investigar la posibilidad de que un individuo tenga una Hb variante, mientras que si la puntuación es baja el diagnóstico es poco probable.

También se analizaron las diferencias entre portadores de Hb S y Hb C, que son las dos variantes de Hb más frecuentes en nuestro medio y las de mayor trascendencia clínica. Los portadores de Hb C presentaron un tamaño menor (mayor VCM y %MICRO) y una mayor densidad (CHCM, %HIPER) que los portadores de Hb S.

Cuando se analizaron los portadores de Hb S o Hb C que además presentaban una α -talasemia se observó que, en ambos casos, presentaban mayor microcitosis, hipocromía y anisocitosis. Estos resultados son similares a los publicados en la literatura, con la novedad de que en esta tesis se han incluido las poblaciones eritrocitarias en el análisis.

En conclusión, los hallazgos de la presente tesis doctoral han permitido profundizar en el conocimiento de la hematimetría y en su aplicación como herramienta de diagnóstico de presunción de las hemoglobinopatías. Estos hallazgos han demostrado que: a) el ADE es el parámetro que mejor discrimina entre portadores de $\delta\beta$ -talasemia

y β -talasemia y tiene una fuerte correlación con el porcentaje de Hb F de estos individuos, b) las diferencias en parámetros de laboratorio de los hematíes maduros encontradas en $\delta\beta$ -talasemia, β -talasemia y ferropenia también se pueden observar en los parámetros reticulocitarios, c) se puede predecir que un individuo sea portador de hemoglobinopatía estructural mediante un modelo estadístico basado en parámetros del hemograma, d) los hematíes de portadores de Hb C son más densos y más pequeños que los hematíes de portadores de Hb S.

ABSTRACT

Haemoglobinopathies are the most common genetic disorders worldwide and constitute a significant public health problem. They are caused by mutations in the globin genes and/or regulatory elements that may produce defective synthesis (thalassaemias) or change the structure of the gene products [structural haemoglobinopathies or variant haemoglobins (Hb)].

There has been a significant impact of migration flows in their increase of prevalence in first-world countries and haemoglobinopathies have become an emerging public health problem. The health burden of haemoglobinopathies is expected to increase in the upcoming decades, so the number of individuals needing diagnosis and management for these conditions is increasing in both underdeveloped and first-world countries. Therefore, efficient screening programmes are becoming necessary. Clinicians need to be able to accurately identify Hb variant carriers and provide adequate genetic counseling to them in order to prevent the occurrence of homozygous or compound heterozygous offspring as far as possible.

The general aim of this thesis work is to broaden the knowledge about the role of the red blood cell (RBC) laboratory parameters provided by the Advia 2120 analyser in the diagnosis of haemoglobinopathies.

The specific aims are: 1) to analyze the differences not only in classic haematologic parameters but also in RBC subpopulations among $\delta\beta$ -thalassaemia trait ($\delta\beta$ -TT), β -thalassaemia trait (β -TT), and iron deficiency anaemia (IDA); 2) to clarify the role of Hb F in elevated RDW; 3) to analyse the differences in reticulocyte indices between $\delta\beta$ -TT,

β -TT and IDA; 4) to correlate those differences with the physiopathological features of these three types of microcytosis; 5) to identify RBC laboratory parameters that discriminate between structural haemoglobinopathy carriers and healthy subjects; and 6) to compare RBC laboratory indices between HbAS and HbAC individuals.

Red blood cell distribution width (RDW) was significantly higher in $\delta\beta$ -TT compared with β -TT, as was mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC). Pearson coefficient showed a good correlation between Hb F and RDW. The values obtained for all the parameters were significantly different between patients with thalassemia (β and $\delta\beta$) and IDA.

Previously described differences between $\delta\beta$ -TT, β -TT and IDA in the corpuscular indices of mature red blood cell can also be observed in reticulocytes. RDWr was significantly higher in $\delta\beta$ -TT compared with β -TT, and so were HDWr, CHr and MCVr. Iron deficient subjects present a higher percentage of immature reticulocytes, but lower absolute number of reticulocytes compared with thalassaemic individuals, suggesting a more inefficient erythropoietic activity.

The erythrocytes of structural haemoglobinopathy carriers are smaller, denser and have a slightly higher degree of anisocytosis than erythrocytes of healthy subjects. There are significant differences in most of laboratory parameters between variant Hb carriers and healthy subjects. A clinical prediction rule was developed by assigning one point to each of the most efficient variables: mean corpuscular volume (MCV) <88.4 fl, RBC distribution width (RDW) >13.4%, percentage of microcytic RBC (%MICRO) >0.7% and the ratio of microcytic RBC to hypochromic RBC (M/H) >0.8. A score of 0, 1, 2, 3 or

4, resulted on a probability of 9.64%, 36.26%, 66.67%, 85.23% or 98.32% respectively.

Among the most frequent variant Hb, HbAC subjects showed lower values of parameters related to cell size (MCV, %MICRO) and higher values of parameters related to haemoglobin concentration (MCHC, %HYPER) compared to HbAS subjects.

In conclusion, the findings of the present thesis work have broadened the knowledge of haematologic laboratory parameters and their applicability as presumptive diagnostic tools for haemoglobinopathies. These findings have demonstrated that: a) RDW is the most efficient parameter to discriminate between $\delta\beta$ -TT and β -TT, and there is a strong correlation between the percentage of Hb F and RDW in these subjects, b) previously described differences between $\delta\beta$ -TT, β -TT and IDA in the corpuscular indices of mature red blood cell can also be observed in reticulocytes, c) structural haemoglobinopathy investigation should be performed in subjects belonging to ethnic groups with high prevalence of variant Hb and showing a score value of 3 or 4, d) erythrocytes of HbAC subjects are smaller and denser than erythrocytes of HbAS subjects.

ABREVIATURAS

%HIPER: porcentaje de hematíes hipercrómicos

%HIPO: porcentaje de hematíes hipocrómicos

%MACRO: porcentaje de hematíes macrocíticos

%MICRO: porcentaje de hematíes microcíticos

2,3-DPG: 2,3-difosfoglicerato

α : alfa

ABC: área bajo la curva

ADE: ancho de distribución eritrocitaria

ADEr: ancho de distribución reticulocitario

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALA: ácido amino levulínico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

β : beta

CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media

CHCMr: concentración de hemoglobina corpuscular media reticulocitaria

CHr: contenido de hemoglobina reticulocitaria

Cl⁻: cloro

CO: monóxido de carbono

CO₂: dióxido de carbono

δ: delta

ε: epsilon

Fe: hierro

fl: fentolitros

FRI: fracción de reticulocitos inmaduros

γ: gamma

g/dl: gramos/decilitro

Glu: ácido glutámico

Gln: glutamina

H₂O: agua

Hb: Hemoglobina

HBAC: cluster de genes alfa globina

HBBC: cluster de genes beta globina

HCM: hemoglobina corpuscular media

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

H-RTC: reticulocitos con contenido alto de ARNm

K⁺: potasio

Kb: kilobases

l: litro

LCR: región de control del locus de la beta globina

L-RTC: reticulocitos con bajo contenido de ARNm

Lys: lisina

μl: microlitros

μm: micrometros

M/H: cociente microcitosis/hipocromía

MLPA: amplificación múltiple dependiente de sonda

mmHg: milímetros de mercurio

M-RTC: reticulocitos con contenido medio de ARNm

Na⁺: sodio

nm: nanómetros

O₂: oxígeno

P₅₀: presión parcial de O₂ para la cual la hemoglobina se encuentra saturada al 50%

pb: pares de bases

PBG: porfobilinógeno

PCO₂: presión parcial de dióxido de carbono

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pg: picogramos

PHHF: persistencia hereditaria de hemoglobina fetal

PO₂: presión parcial de oxígeno

Ret He: equivalente de hemoglobina reticulocitaria

RST: receptor soluble de la transferrina

RT: receptor de la transferrina

SDS: sodio dodecil sulfato

Val: valina

VCM: volumen corpuscular medio

VCMr: volumen corpuscular medio reticulocitario

ζ: zeta

INTRODUCCIÓN

1. HEMOGLOBINA

1. 1. CONCEPTO

La hemoglobina (Hb) es una proteína globular, que se encuentra en grandes cantidades dentro de los hematíes, y que tiene una gran importancia fisiológica para el aporte normal de oxígeno (O₂) a los tejidos. Es de un color rojo característico, y transporta el O₂ desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, el dióxido de carbono (CO₂) desde los tejidos hasta los pulmones que lo eliminan, y también participa en la regulación de pH de la sangre en vertebrados y algunos invertebrados. Sus valores normales en sangre son 13–18 g/dl en el hombre y 12–16 g/dl en la mujer.

1. 2. ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA

La Hb es una molécula casi esférica con un diámetro de unos 5,5 nm. Es una proteína tetramérica con 4 grupos prostéticos Hemo, uno asociado con cada cadena polipeptídica. El Hemo consiste en un ión divalente de hierro (ión ferroso, Fe²⁺) contenido en el centro de un gran heterociclo orgánico llamado porfirina, constituido por cuatro grupos pirrólicos unidos entre sí. La hemoglobina adulta (Hb A) contiene 2 tipos de cadenas de globina: 2 α (cada una de ellas constituida por 141 residuos) y 2 β (de 146 residuos cada una), con dos ejes de simetría (*Bunn et al, 1986; Weatherall et al, 1981*). Su estructura presenta varios niveles de complejidad. La estructura primaria está formada por la secuencia de aminoácidos ensamblada mediante uniones covalentes (enlaces peptídicos y puentes disulfuro). Por otro lado, la estructura secundaria hace referencia a la disposición de los aminoácidos en patrones

estructurales típicos como la hélice α o la lámina β , que son especialmente estables (*Pain et al, 1970; Krigbaum et al, 1973*).

La estructura terciaria se define como el plegamiento de la estructura secundaria para dar lugar a una estructura globular o subunidad proteica. Es decir, qué situación en el espacio ocupan los residuos de aminoácidos que forman parte de la estructura lineal (*Lindstrom et al, 1973*). Finalmente, la estructura cuaternaria consiste en la asociación de las distintas subunidades de la proteína (*Nelson et al, 2008; Kakar et al, 2010*).

Las cadenas de Hb humana han sido denominadas de acuerdo con las letras del alfabeto griego. Existen 6 tipos diferentes de cadenas de globina (dos tipo alfa y cuatro tipo beta o no alfa): Alfa (α), Beta (β), Gamma (γ), Delta (δ), Epsilon (ϵ) y Zeta (ζ). De las combinaciones dos a dos entre las cadenas tipo alfa y no alfa de las diferentes cadenas de globina se van a formar las diferentes hemoglobinas, en los períodos embrionario, fetal, neonatal y adulto (*Voet et al, 1990; Perutz et al, 1970; Dikerson et al, 1983*).

1. 3. FUNCIONES DE LA HEMOGLOBINA

Su función principal es la de transportar O_2 desde los pulmones hasta los tejidos. Para la realización de esta función es esencial el mantenimiento de la estructura y la configuración espacial de la molécula de Hb (*Villegas et al, 2001A; Safo et al, 2011*). La Hb tiene dos formas cuaternarias distintas. La primera es la forma T (tensa) o desoxiHb que es muy estable en ausencia de O_2 . La segunda es la forma R (relajada) u oxiHb, que se estabiliza gracias al O_2 . La curva de disociación del O_2 es sigmoidea debido a la cooperatividad que existe para unir las moléculas de O_2 (Figura 1), ya que estas favorecen un cambio conformacional (de la forma T a la forma R) en las subunidades

restantes, lo que facilita la unión de más moléculas de O₂ en dichas subunidades. En consecuencia, la Hb se comporta como una enzima alostérica (*Nelson et al, 2008*).

Se define P₅₀ como la presión parcial de O₂ para la cual la Hb se encuentra saturada al 50%. En condiciones fisiológicas la P₅₀ es de 26,6 mmHg. La P₅₀ se entiende como una medida inversa de la afinidad; es decir, a mayor afinidad de la Hb por el O₂, menor será el valor de la P₅₀ y viceversa.

Existen diversos factores fisiológicos que regulan la afinidad de la Hb por el O₂ tales como el pH, temperatura, presión parcial de CO₂ (pCO₂) y presencia de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) (*Dikerson et al, 1983*). La influencia del pH se conoce como efecto Böhr y consiste en una disminución de la afinidad a pH ácido, lo que facilita la liberación de O₂ en los tejidos donde el ión bicarbonato y el ácido láctico acidifican el medio (*Riggs et al, 1988*). Lo mismo ocurre con el aumento de temperatura o de pCO₂. Además, existen otros factores exógenos y endógenos que pueden afectar a la P₅₀.

Entre los que producen una disminución de la afinidad se encuentran el proceso de adaptación a la altitud, el hipertiroidismo, la obstrucción pulmonar grave y la anemia crónica. Todas estas situaciones generan un aumento de 2,3-DPG, que es el responsable de la disminución de la afinidad. a presencia de 2,3-DPG aumenta el valor de la P₅₀, es decir, disminuye la afinidad de la Hb por el O₂, desplaza la curva de disociación de la Hb hacia la derecha, y aumenta la cesión de O₂ a los tejidos.

Además de estos factores, existen Hb patológicas con afinidad disminuida. Por otro lado, en los estados de shock o la sangre almacenada disminuye el 2,3-DPG y, por tanto, la afinidad de la Hb por el O₂ aumenta. También hay Hb variantes patológicas con la afinidad aumentada.

Otra de sus funciones es el transporte de óxido nítrico, un potente vasodilatador.

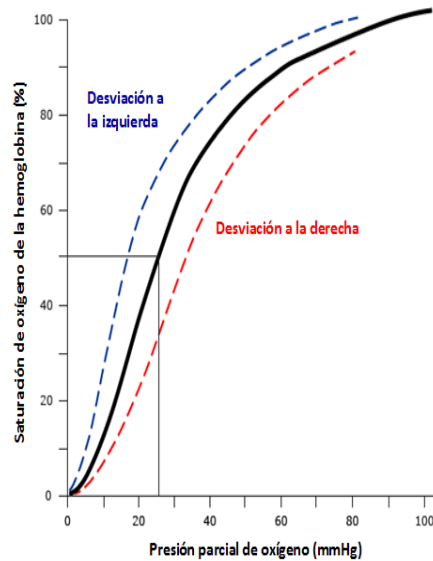


Figura 1. Curva de disociación de la oxihemoglobina. Cuando la afinidad por el O_2 está aumentada, la curva de disociación de la Hb está desplazada hacia la izquierda y por lo tanto, la P_{50} está disminuida. Por el contrario, se encuentran valores de P_{50} más altos en situaciones que impliquen disminución de afinidad por el O_2 . En esos casos la curva de disociación se desplaza hacia la derecha.

1. 4. SÍNTESIS DE GLOBINA

Los seis tipos diferentes de cadenas de globina (α , β , γ , δ , ϵ , ζ) se expresan en diferentes etapas del desarrollo humano, lo que requiere la existencia de un mínimo de seis genes estructuralmente diferentes (*Fritsch et al, 1980*) (Figura 2).

Todos los genes de globina son estructuralmente similares, y están constituidos por tres dominios fundamentales: la región promotora (situada a la izquierda en el extremo 5'), el gen estructural y la región de poliadenilación (que se sitúa a la derecha en el extremo 3'). Además, en cada cluster existe una región reguladora, esencial para la transcripción de cada gen. En el cluster beta esta región recibe el nombre *LCR (locus control region)* y se encuentra situada 5' al gen epsilon a unas 20 Kb del gen beta, y en el cluster alfa se denomina HS-40 y se sitúa a unas 40 Kb del gen zeta. En estas regiones se unen los factores de transcripción específicos del eritrocito (GATA-1 y NF-

E2) que, posteriormente, interactuarán con los factores de transcripción de las zonas promotoras para que se realice la transcripción.

La región promotora comprende aproximadamente 150 pb y está constituida por una serie de secuencias esenciales para la iniciación exacta y eficiente de la transcripción.

Estas secuencias se agrupan en tres grupos o bloques denominados cajas, que se han mantenido constantes en los diferentes genes y donde se fijan los diferentes factores

que regulan la transcripción. El gen estructural contiene tres secuencias codificadoras (exones) separadas por dos secuencias que no se traducen (intrones) (*González et al,*

2015). En el extremo 5' del 1º exón y en el extremo 3' del 3º exón existen dos

pequeñas secuencias que se transcriben y no se traducen denominadas UTR, que son

importantes para regular la traducción (en el caso de la 5' UTR) y para la estabilidad del

ARNm (en el caso de 3' UTR). Finalmente, la región de poliadenilación (Poly A) se sitúa

a la derecha (extremo 3'), y es esencial para el transporte del ARNm del núcleo al

citoplasma y para su estabilidad (*González et al, 2015*).

Después de la transcripción, el ARNm monocatenario es sometido a una serie de

modificaciones (procesamiento) para que pueda pasar del núcleo al citoplasma y servir

de molde para la traducción. Así, el extremo 5' es modificado por el proceso

denominado "*capping*", que consiste en la adición del CAP (7-metil-guanosina) al

nucleótido 1 del ARNm (*Talkington et al, 1980*). Esta estructura contribuye al aumento

en la eficacia de la traducción y estabilidad del ARNm. En el extremo 3' tiene lugar la

escisión del ARNm por la secuencia AAUAAA seguida de la adición, en ese mismo

punto, de la cola del Poly A, aproximadamente unas 200 pb (*González et al, 2015*).

La última modificación que sufre el ARNm antes de su traducción, es el proceso conocido como "*splicing*" (empalme), durante el cual los intrones son eliminados y los exones se unen para formar un ARNm maduro.

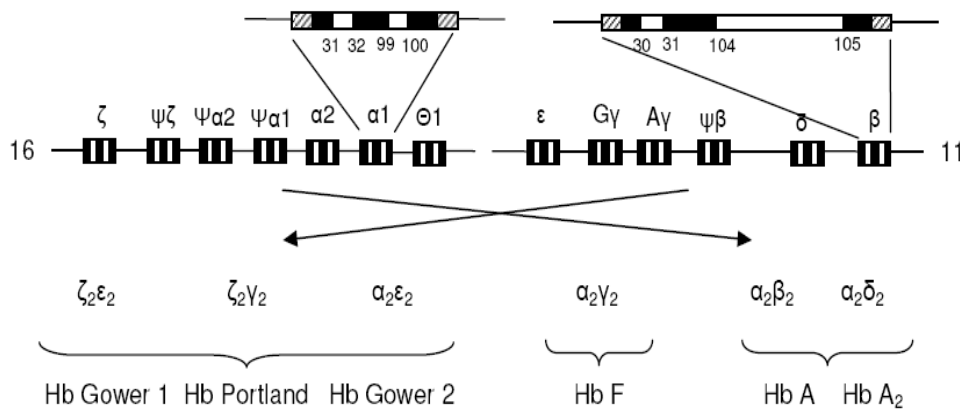


Figura 2. Clusters de genes de globina

La expresión del gen de la globina en el *HBBC* sufre dos cambios durante la ontogenia: el cambio de Hb embrionaria a fetal, coincidiendo con la transición de hematopoyesis primitiva a la definitiva, y el cambio de globina fetal a adulta durante el período perinatal (Ver apartado 1.8: Ontogenia de la Hemoglobina Humana). Ambos cambios se controlan exclusivamente a nivel transcripcional (*Stamatoyannopoulos et al, 2001*). Posteriormente, la traducción de cadenas de globina se produce en el citosol de eritroblastos y reticulocitos.

1. 5. ENSAMBLAJE DE LAS SUBUNIDADES DE HEMOGLOBINA

Las propiedades fisiológicas de la Hb dependen del ensamblaje ordenado de subunidades en los precursores eritroides. Una biosíntesis eficiente de Hb requiere la producción balanceada de cadenas polipeptídicas α y β , permitiéndose un ligero

desajuste en la biosíntesis debido a los eficaces mecanismos proteolíticos de los precursores eritropoyéticos (*Jelinec et al, 1982*).

Una vez que cantidades equivalentes de subunidades α y β han sido traducidas de sus respectivos polirribosomas y que el Hemo ha sido insertado, las subunidades de Hb formarán dímeros α - β facilitados por la atracción electrostática de la subunidad α cargada positivamente con la subunidad β cargada negativamente. Estos dímeros se disocian muy lentamente, al contrario que el tetrámero que se disocia en dímeros con facilidad (*Anfinsen et al, 1973; Perutz et al, 1970*).

Este modelo de ensamblaje de la Hb es capaz de explicar los diferentes niveles de variantes de Hb con cargas positivas y negativas que pueden encontrarse en individuos heterocigotos, así como el efecto que la α -talasemia y los estados de deficiencia de Hemo ejercen en la modificación del nivel de las variantes de Hb.

Como podría esperarse del patrón de herencia, ya que un gen es heredado de cada progenitor, un individuo heterocigoto para una variante de cadena β debería tener aproximadamente niveles iguales de Hb normal y anormal. Sin embargo, diversos factores independientes influyen la formación de Hb normal y de variantes.

Por un lado, algunas variantes de Hb se sintetizan en una cuantía significativamente más baja que su contrapartida normal. Tal es el caso de la Hb E, Hb Lepore y Hb Knossos (*Orkin et al, 1984*), en las cuales la mutación conduce a un defecto en el procesamiento del ARNm y por tanto a una síntesis reducida de la proteína que origina y, en consecuencia, un fenotipo talasémico. Por el contrario, la gran mayoría de las variantes tienen unos índices de transcripción y traducción normales, existiendo otros factores que determinan la cuantía de esta Hb en los hematíes. Algunos de estos factores son:

1) Estabilidad de la subunidad anómala. La mayoría de las variantes inestables de la cadena β representan menos del 20% del total de Hb debido a un aumento en el catabolismo de la variante, tanto en los precursores eritroides como en la circulación periférica.

2) Diferencia en la velocidad del ensamblaje de las subunidades. Esto puede explicar las desigualdades en los niveles de la mayor parte de las variantes estables. En estos casos, si la variante β es producida con velocidad, estabilidad y solubilidad normal, los heterocigotos deberían tener igual cantidad de Hb normal que anormal. Sin embargo, en muchas ocasiones no ocurre así, encontrándose variantes β en cantidades significativamente más bajas que la Hb A. Esto suele producirse con las Hb anormales que poseen cadenas cargadas positivamente en las que, además, al asociarse con α -talasemia, la cantidad de variante cargada positivamente disminuye en proporción al número de genes α delecionados. En contraste, las variantes cargadas negativamente están a menudo presentes en cantidades mayores que la Hb A en los heterocigotos cuando se asocian con α -talasemia (*Beale et al, 1965*).

1. 6. HEMOGLOBINAS EMBRIONARIAS

En 1961, Huehns y colaboradores descubrieron dos nuevas Hb en la sangre de embriones humanos (*Huehns et al, 1961*). Dichos autores observaron que ambas eran diferentes de la Hb A y de la Hb F, y dichas Hb embrionarias fueron denominadas Gower 1 y Gower 2. Posteriormente, Capp y colaboradores denominaron Hb Portland I a una nueva Hb que poseía propiedades electroforéticas semejantes a la Hb A a pH alcalino, pero que migraba más rápidamente que esta a pH ácido (*Capp et al, 1970*).

Unos años más tarde, en 1984, Randhawa y colaboradores descubrieron las Hb Portland II y III (*Randhawa et al, 1984*). Las Hb embrionarias tienen una afinidad por el O₂ similar a la de las Hb de los recién nacidos. En cuanto a su estructura, las Hb embrionarias están formadas de la siguiente manera, siendo la cadena ζ “α-like” y la cadena ε “β-like” (*Huehns et al, 1961*):

Hb Gower 1: de estructura [$\zeta_2\epsilon_2$]

Hb Gower 2: de estructura [$\alpha_2\epsilon_2$]

Hb Portland: de estructura [$\zeta_2\gamma_2$]

Son tres hemoglobinas transitorias, con una elevada afinidad por el oxígeno.

1. 7. HEMOGLOBINAS NORMALES DEL RECIÉN NACIDO Y DEL ADULTO

1. 7. 1. HEMOGLOBINA FETAL (Hb F)

Constituye en el recién nacido el 60-95% del total de Hb. Dichos niveles descienden progresivamente durante los 6 primeros meses de vida hasta alcanzar el 2% aproximadamente, y después se mantienen >1% en la mayoría de casos hasta los 2 años. En adultos los valores normales están por debajo del 1% (*Pataryas et al, 1972*).

Es una Hb heterogénea, cuya cadena γ difiere de la β en 39 de los 146 aminoácidos. En 1968 se demostró la existencia de dos cadenas gamma, denominadas γ^G (cadena con un residuo de glicina en la posición γ¹³⁶) y γ^A (cadena con un residuo de alanina en la posición γ¹³⁶). En el recién nacido el 68-75% es γ^G y el 25-32% es γ^A (ratio 3:1); por el contrario, en el adulto, la pequeña cantidad de Hb F que existe contiene 40% de γ^G y 60% de γ^A, teniendo lugar dicha transición en el 1º año de vida (*Gilman et al, 1985*).

Es relativamente frecuente, en la cadena gamma, la sustitución de treonina por isoleucina en la posición 75. Esta sustitución se produce exclusivamente en la cadena γ^A , por lo que se designa como γ^T , y se conoce como Hb F Sardinia. Esta variante de Hb F se ha descrito en el 30% de los recién nacidos blancos y en el 20% de los negros americanos (*Huisman et al, 1991*).

Desde el punto de vista funcional, la Hb F tiene una mayor afinidad por el O_2 que la Hb A. Esto es consecuencia de la incapacidad de la Hb F para unirse al 2,3-DPG con la misma intensidad que la Hb A, lo que le aporta una ventaja funcional en la captación de O_2 a presiones bajas (PO_2 45 mmHg), como sucede en el intercambio placentario. Los niveles de Hb F en el adulto se sitúan por debajo del 2%. Sin embargo, el desarrollo de los métodos de HPLC ha demostrado que dichos niveles pueden ser ligeramente superiores en hemoglobinopatías como la $\delta\beta$ -talasemia fundamentalmente, aunque también en β -talasemia, en homocigotos para Hb S, Hb C y Hb E, así como en otros trastornos adquiridos como anemia megaloblástica, y muy superiores en aquellos individuos con Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal (PHHF) (*Nagel et al, 1990*). Además, los niveles de Hb F pueden verse afectados por diferencias en la atracción para ensamblaje de unas cadenas de globina con otras. Se ha sugerido que las subunidades alfa se combinan con menor facilidad con las gamma que con las beta, observándose Hb F más baja en recién nacidos con α -talasemia que en aquellos recién nacidos normales o con déficit de hierro.

1. 7. 2. HEMOGLOBINA DE BART

Se encuentra en cantidades menores del 2% en los neonatos normales. Es un tetramero γ_4 funcionalmente anómalo, con una afinidad aumentada por el O_2 y

ausencia de la interacción Hemo-Hemo y efecto Böhr. Se encuentra significativamente aumentada en los recién nacidos con alfa talasemia y excepcionalmente en el adulto.

1. 7. 3. HEMOGLOBINA A

Aproximadamente constituye el 97% del total de Hb en el adulto, mientras que en el recién nacido tan solo representa un 20-40%. Está formada por dos cadenas α y otras dos β unidas por 4 grandes áreas de contacto: interfases $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_1\beta_2$ y $\alpha_2\beta_1$.

1. 7. 4. HEMOGLOBINA A₂

Está formada por dos cadenas α y dos cadenas δ . En el neonato representa menos del 0.5% del total de la Hb, mientras que en adultos supone aproximadamente el $2 \pm 0.3\%$. Su estructura es muy homogénea debido a que las cadenas β y δ de Hb tan sólo difieren en 10 de los 146 aminoácidos que componen la secuencia primaria de la cadena β . Su significado fisiológico no se conoce con exactitud aunque probablemente tenga una función parecida a la Hb A.

Está siempre aumentada en las β -talasemias, y pueden encontrarse también valores elevados en algunas de las variantes de Hb como la Hb SS, en la anemia megaloblástica, el hipertiroidismo y en algunos pacientes con malaria. Por otra parte, se encuentra disminuida en estados de carencia de hierro, anemias sideroblásticas, y en las α , δ , $\delta\beta$ -talasemias, Hb Lepore y en la PHHF (*Steinberg et al, 1991*).

1. 7. 5. OTRAS HEMOGLOBINAS

Además de estas hemoglobinas, existen otras denominadas menores, llamadas A_{1a}, A_{1b}, A_{1c}, A_{1d} y A_{1e}. La más importante es la Hb A_{1c}, que supone aproximadamente un

3% del total de Hb en los hematíes adultos normales (*Garlick et al, 1983*). Difiere de la Hb A únicamente en el grupo amino N-terminal de cada cadena beta, el cual está unido de forma no enzimática a una molécula de glucosa (*Bookchin et al, 1968; Bunn et al, 1975*). Los pacientes con diabetes mellitus tienen niveles de Hb A_{1c} que son 2-3 veces superiores a los valores normales (*Bunn et al, 1978*). Se ha demostrado que la medición de Hb A_{1c} constituye un excelente marcador independiente del grado de control diabético.

1. 8. ONTOGENIA DE LA HEMOGLOBINA HUMANA

A lo largo del desarrollo del ser humano la síntesis de Hb no se produce de manera uniforme, sino que, tanto el tipo de cadena de globina predominante como el órgano donde se sintetiza, van cambiando con el tiempo (Figura 3). La expresión génica define el tipo de Hb circulante, y es clave para entender la heterogeneidad de los tetrameros de Hb.

Las Hb que predominan durante el período embrionario son las Gower 1, Gower 2 y Portland. Se ha visto que, en los embriones más jóvenes examinados a los 37 días de gestación, la proporción de Hb Gower 1 y Gower 2 es del 42% y 24% del total respectivamente, y el resto de la hemoglobina es Hb F. En etapas posteriores la proporción de Hb Gower desciende progresivamente, hasta ser casi indetectables en la semana 10-12 de gestación (*Nienhuis et al, 1981; Capp et al, 1970; Hech et al, 1966*).

En cuanto a la Hb Portland, su tiempo de aparición y desaparición ha sido más difícil de determinar, ya que su migración en el gel de almidón es muy similar a la de la Hb A. En los fetos normales, a la 10ª semana de gestación se observa un 20% de Hb Portland del total de Hb (*Deisseroth et al, 1976*).

La Hb F aparece precozmente durante la gestación, constituyendo el 30% del total de Hb a los 37 días de la gestación y el 90% hacia la 8ª-10ª semanas, permaneciendo así hasta poco antes del parto. Ambas cadenas γ y α se sintetizan desde el principio del embarazo y su relación es de aproximadamente 3:1, que se mantiene constante. A los seis meses de vida extrauterina la cantidad de Hb F es menor del 1%, aunque en niños normales puedan verse con frecuencia niveles del 2-5%, para posteriormente situarse, al año, en valores menores del 1%, que mantendrá durante toda la vida.

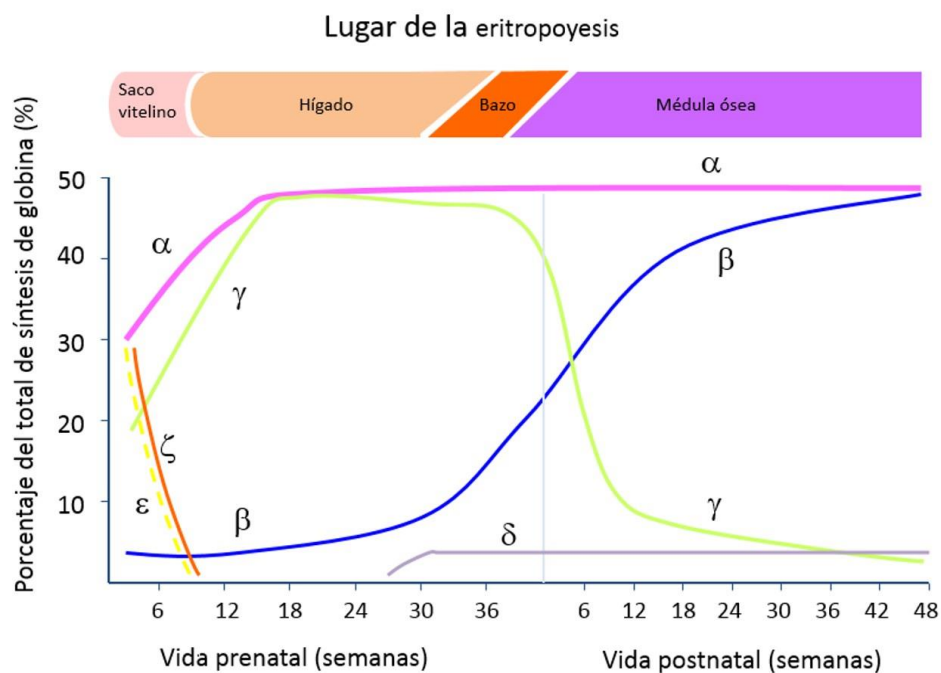


Figura 3. Ontogenia de las cadenas de globina. Cambios en la síntesis de cadenas de globina a lo largo del desarrollo y órganos donde se producen

La Hb A, en cuantía del 5%-10%, se detecta en fetos normales desde la 6ª semana de gestación en adelante, aunque electroforéticamente no sea demostrable hasta la 12ª semana (Deisseroth et al, 1976). Pequeñas cantidades de cadena β pueden comprobarse por síntesis de globinas antes de la 6ª semana. Posteriormente, hacia la

semana 12-20, se observa un ligero incremento en la síntesis de la cadena β , que ya va a permanecer constante hasta iniciarse la síntesis de Hb A.

La Hb A₂ es la última en aparecer. Comienza a sintetizarse en el tercer trimestre de la gestación, detectándose únicamente trazas de Hb A₂ en la sangre del cordón umbilical en el momento del parto. Su síntesis se va incrementando entre los seis y doce primeros meses de vida, momento en el que alcanza sus niveles definitivos.

Debido a que cada cadena de globina comienza a sintetizarse en un momento diferente del desarrollo, es fácil de comprender que las anomalías, tanto en su síntesis como en su estructura, de los diferentes tipos de cadenas de globina se van a manifestar en etapas diferentes.

Los defectos de las cadenas alfa se manifiestan mejor en los períodos fetal y neonatal. Después del parto, la síntesis de cadena beta va aumentando y, puesto que la apetencia de la cadena alfa es mayor por la beta que por la gamma, las cantidades de Hb Bart (γ_4) se cuantifican mejor en el neonato que en el adulto. Además, como la cadena alfa forma parte de las Hb Gower 2, Hb F, Hb A y Hb A₂, la síntesis de cadena alfa se va a manifestar en todas las etapas del desarrollo. En cuanto a las variantes estructurales de cadena alfa que pueden aparecer, van a tener el mismo porcentaje de Hb anómala en el período neonatal que en el adulto. En cuanto a las anomalías de los genes de la beta globina, sólo se manifiestan de forma significativa en la etapa postnatal, habitualmente en el segundo semestre de vida, cuando la Hb A normal que debería sustituir a la Hb F no está presente (talasemia) o es anormal (hemoglobinopatía estructural de cadena beta). Por último, las variantes de Hb F (cadena γ) se detectan mejor en el período neonatal, desapareciendo en la vida adulta.

2. ENFERMEDADES DE LA HEMOGLOBINA

Las hemoglobinopatías constituyen las alteraciones monogénicas más frecuentes en el mundo. Se producen por mutaciones puntuales, deleciones o inserciones en los genes que codifican las cadenas de globina, que pueden determinar una alteración cualitativa en la expresión de dichos genes (en el caso de las hemoglobinopatías estructurales) o una disminución o ausencia de la expresión de las cadenas de globina estructuralmente normales (en el caso de las talasemias) (*Huisman et al, 1993*).

A pesar de que en la gran mayoría de ellas la alteración estructural no condiciona ningún cambio significativo, por lo que cursan de forma silente o asintomática, las hemoglobinopatías estructurales y las talasemias constituyen uno de los problemas de salud pública más importantes en el mundo (*Bunn et al, 1986*). No obstante, su incidencia es muy variable de unas regiones a otras, de forma que en algunos países como los norte-europeos su prevalencia es muy baja mientras que en otros son tan comunes que la mayor parte de su población es portadora de al menos una anomalía genética que afecta a la estructura o a la síntesis de la Hb (*Modiano et al, 1991*).

El hecho de que las denominadas hemoglobinopatías comunes (α y β talasemias, Hb S, Hb C y Hb E) sean tan prevalentes en algunas regiones se explica fundamentalmente por la protección que confieren a los sujetos portadores frente a la infección por *Plasmodium*, originándose de esta forma una selección natural que es la responsable de estas altas y mantenidas prevalencias (*Kreuels et al, 2010; Bunn et al, 2013*).

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que en las zonas endémicas de malaria las hemoglobinopatías se presentan con una alta frecuencia, mientras que en las regiones del mundo donde no existe o no ha existido malaria constituyen una rareza, debiéndose a mutaciones ocasionales o esporádicas. A pesar de que la distribución mundial de la malaria y de las hemoglobinopatías comunes se superpone, esta distribución es parcheada, de tal forma que, pese a que en casi todas las regiones con malaria existen hemoglobinopatías, estas no tienen por qué ser las mismas en dichas áreas geográficas, y cada hemoglobinopatía se circunscribe relativamente a una región determinada. La Hb S alcanza sus máximas frecuencias en el África tropical y subtropical, península arábiga e India, la Hb C en el oeste de África, la Hb E en el sureste de Asia, la β -talasemia en la cuenca del Mediterráneo y Asia y la α -talasemia en la India, sureste de Asia y Oceanía (*Williams et al, 2012; Piel et al, 2014*).

Con el fin de explicar estas marcadas diferencias en la distribución geográfica de las distintas hemoglobinopatías se ha sugerido que esta especie de selección natural debida a la malaria habría tenido lugar en un período histórico relativamente reciente de las poblaciones humanas. Para que esta selección se produjera era necesaria una alta densidad de población, la cual no ocurrió hasta el surgimiento de la agricultura en los últimos 5000 años. Estudios de caracterización molecular de las diferentes mutaciones y polimorfismos que determinan los diferentes haplotipos de los cromosomas portadores de las mutaciones responsables de las hemoglobinopatías estructurales, sugerían la posibilidad de que algunas de las mutaciones comunes (Hb S y Hb E) aparecieran como eventos recientes sobre diferentes poblaciones ancestrales. Sin embargo, una observación más crítica de estos resultados indica que estas

hemoglobinopatías podrían tener cada una un solo origen y se habrían distribuido por recombinación y conversión genética en una variedad de haplotipos diferentes, que emergerían en cada subpoblación por la selección de la malaria, aumentando así dramáticamente su prevalencia (*Flint et al, 1998*).

2. 1. TALASEMIAS

Las talasemias constituyen un grupo heterogéneo de anemias hereditarias que se transmiten con carácter autosómico recesivo y que se caracterizan por una disminución o ausencia en la síntesis de una o más de las cadenas de globina que forman la Hb, como consecuencia de mutaciones, deleciones o inserciones en los genes que codifican dichas cadenas. Por tanto, las talasemias suponen un defecto cuantitativo en la síntesis de la Hb (cuya estructura es normal), a diferencia de las hemoglobinopatías estructurales en las que las alteraciones moleculares de estos mismos genes determinan un cambio de uno o más aminoácidos en la estructura de la cadena defectuosa y por tanto suponen defecto cualitativo (*Bain, 2011; Higgs et al, 1989; Higgs, 1993*).

Se clasifican según la cadena o cadenas de globina afectadas (Tabla 1) siendo las α y β -talasemias las más importantes por su frecuencia. También se incluyen en las talasemias las variantes de Hb en las que, además del defecto cualitativo, también hay una disminución en la síntesis de esa cadena anómala y se comportan fenotípicamente como una talasemia. Las α y β talasemias son además subdivididas en formas α^0 y β^0 , en las cuales no se produce síntesis de la cadena afectada, y en formas α^+ y β^+ cuando la cadena es sintetizada pero en cantidad reducida.

Tabla 1. Clasificación de las talasemias

α talasemia

β talasemia

$\delta\beta$ talasemia

$\gamma\delta\beta$ talasemia

$\epsilon\gamma\delta\beta$ talasemia

δ talasemia

γ talasemia

hemoglobinopatías estructurales con fenotipo talasémico

Desde un punto de vista genotípico, en el caso de la β -talasemia, al existir un solo gen β en cada locus o cromosoma, uno heredado del padre y otro de la madre, tendremos β -talasemias heterocigotas que pueden ser alelos β^+ o β^0 , correspondiendo estos casos heterocigotos a los portadores asintomáticos o en ocasiones a talasemias intermedias leves, mientras que los casos homocigotos o dobles heterocigotos corresponden a las formas severas talasemia mayor o talasemia intermedia grave.

En las α -talasemias, al existir dos genes α en cada alelo, va a existir una mayor complejidad genética, de forma que se distinguen principalmente 4 formas clínicas: pérdida de un gen α en un alelo (α^+ -talasemia heterocigota); pérdida de dos genes α bien un mismo alelo (α^0 -talasemia heterocigota) o bien uno en cada alelo (α^+ -talasemia homocigota); enfermedad de la Hb H, que cursa como a una talasemia intermedia con un grado de anemia muy variable y que corresponde a la pérdida de dos genes α en un alelo y a la pérdida de uno en el otro alelo o en algunos casos de α -talasemia no

deleción a la pérdida funcional del gen α_2 en cada alelo; e *Hidrops fetalis* por Hb Bart, que es incompatible con la vida y que corresponde a la pérdida de los cuatro genes α .

Desde un punto de vista clínico, las talasemias, según su expresividad, se dividen en:

Talasemia Mayor (dependencia transfusional), Talasemia Intermedia (grupo heterogéneo de síndromes talasémicos sintomáticos que precisan transfusiones ocasionales/frecuentes), Talasemia minor (asintomáticos, tienen microcitosis e hipocromía) y Portadores Silentes (no presentan síntomas y ni siquiera tienen microcitosis ni hipocromía).

2. 1. 1. FISIOPATOLOGÍA.

La repercusión fisiopatológica y las consecuencias clínicas derivadas de estos trastornos vienen determinadas, en primer lugar, porque, al sintetizarse menos cantidad de una cadena de globina, se forma menos Hb normal dando lugar a la aparición de microcitosis e hipocromía. Por otro lado, otro mecanismo que juega un papel fundamental en la anemia que caracteriza a la talasemia consiste en que la cadena producida en cantidad normal, al no poderse aparear con la cadena deficitaria, se agrupa en homotetrámeros más o menos estables o precipita en el interior del hematíe produciendo alteraciones en su maduración con desestructuración de la membrana. Esto favorece la apoptosis de los precursores eritroides dentro de la médula ósea (eritropoyesis ineficaz) o a nivel del eritrocito maduro una disminución en la supervivencia por destrucción en el sistema reticuloendotelial esplénico (hemólisis) (Figura 4).

En la β -talasemia predomina el componente de eritropoyesis ineficaz mientras que en la α -talasemia predomina el componente hemolítico ya que las cadenas α sobrantes en la β -talasemia son mucho más inestables que el exceso de las cadenas γ y β en la α -talasemia (Higgs et al, 2012).

Las manifestaciones clínicas en las formas graves son debidas a la anemia y a la eritropoyesis ineficaz, por lo que existirán signos y síntomas comunes de toda anemia, y signos y síntomas debidos a un aumento de los precursores eritroides en la médula ósea (como alteraciones esqueléticas y osteoporosis) y fuera de ella (como hepatoesplenomegalia y masas paravertebrales de hemopoyesis extramedular).

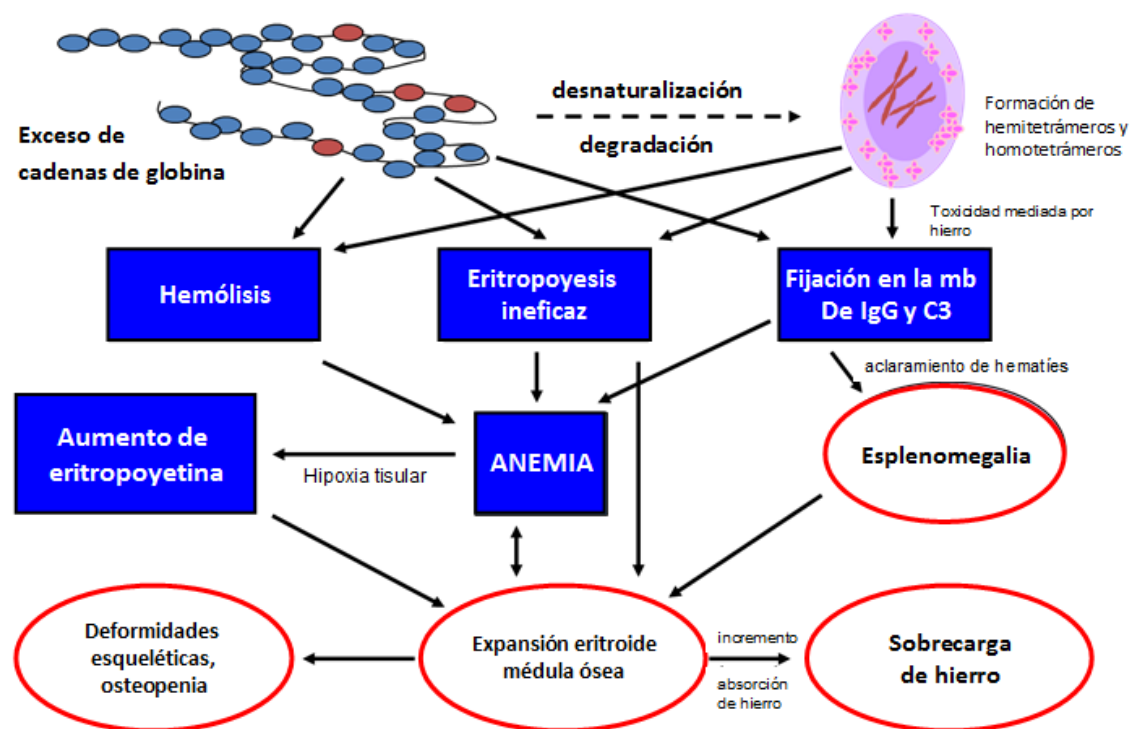


Figura 4. Fisiopatología de la talasemia.

Además, por la anemia, la hipoxia y la expansión de la eritropoyesis, existe una disminución de hepcidina que determina un aumento de la absorción intestinal del

hierro con una sobrecarga de hierro secundaria que se acentuará por las transfusiones en los casos transfusión-dependientes (Figura 4).

La primera vez que se describió la talasemia fue en el año 1925, cuando los pediatras Cooley y Lee describieron en 5 niños la presencia de una anemia congénita con esplenomegalia y cambios característicos en la médula ósea. Sin embargo, no fue hasta 1932 cuando se utilizó por primera vez el término talasemia por Whipple, quien denominó a estos trastornos “anemia talasémica”, nombre que propuso debido a la frecuente presentación de dichos síndromes en la zona mediterránea.

2. 1. 2. ALTERACIONES MOLECULARES DE LAS TALASEMIAS

Los defectos moleculares pueden agruparse en dos grandes tipos: las mutaciones extensas y las puntuales. Las mutaciones extensas son aquellas que implican alteraciones de miles de pares de bases (pb) de la estructura de un cromosoma. Pueden ser duplicaciones, deleciones y reagrupamientos en los que pueden verse involucrados uno o varios genes o bien fragmentos de un gen. Las mutaciones puntuales son las que implican cambios mínimos (normalmente de una sola base) en el ADN, que pueden ser inserciones, deleciones o sustituciones, y que afecta a uno de los diferentes procesos moleculares involucrados en la expresión del gen.

2. 1. 2. 1. β -talasemias

La mayoría de los defectos moleculares corresponden a mutaciones puntuales de un único nucleótido o inserciones o deleciones de pocos nucleótidos que pueden afectar a la transcripción, al procesamiento del pre-ARNm o la traducción. Las mutaciones que afectan a la *transcripción* se localizan en la zona promotora y van determinar una

reducción leve de la síntesis de cadena (β^+). Las mutaciones que afectan al *Procesamiento del ARN* se localizan fundamentalmente en los intrones en las zonas consenso, aceptoras y donadoras donde se realiza el *splicing*, en las zonas 5' y 3' UTR, y dan lugar a disminución variable de la síntesis dependiendo de su localización (β^+ ó β^0). Finalmente las mutaciones que afectan a la *traducción*, que constituyen el grupo más frecuente, se localizan en los exones determinando una ausencia de síntesis por el alelo mutado (β^0).

Al contrario que en las α -talasemias, solamente una minoría de las β -talasemias están producidas por deleciones en el gen. Se han descrito casi 300 alelos diferentes de β -talasemia, la gran mayoría de los cuales está producido por mutaciones que afectan a uno o muy pocos nucleótidos (*Giardine et al, 2011*). Estudios poblacionales indican que tan sólo 20 de estas mutaciones son las responsables de más del 80% de los alelos β -talasémicos (*Kazazian et al, 1988*).

Las deleciones exclusivas del gen β son mucho menos frecuentes que las del gen α , y se circunscriben a determinadas áreas geográficas. En la actualidad, se conocen unas 40 deleciones del gen de la β -globina situadas en la región promotora o en el propio gen y una inserción del retrotransposón L1 en el intrón 2 (IVS2) (*Thein, 1984; Gilman et al, 1984; Padanilam et al, 1984; Popovich et al, 1986; Díaz-Chico et al, 1987; Anand et al, 1988; Auhlehla-Scholtz et al, 1989*). La deleción del gen *HBB* mejor conocida es la de 619 pb en el extremo 3', restringida a individuos de origen indio o paquistaní (*Thein, 1984*). Las deleciones que afectan al extremo 5' del gen β y su región promotora se caracterizan por grandes aumentos de Hb A₂ (7-9%) y de Hb F (10%) (*Gilman et al, 1984; Padanilam et al, 1984; Popovich et al, 1986; Díaz-Chico et al, 1987; Anand et al, 1988; Auhlehla-Scholtz et al, 1989*). Se ha descrito también una deleción completa del

gen β en la β^0 -talasemia Dutch (*Gilman et al, 1984*) y, por supuesto, en diferentes formas de $\delta\beta$ -talasemia donde también se deleciona el gen δ . Finalmente, las inserciones tienen escaso interés clínico porque la única descrita hasta la actualidad (retrotransposón L1 en IVS2) no se acompaña de alteración funcional.

En algunas variantes de Hb, además de un defecto cualitativo, existe una disminución de la síntesis de la cadena anómala y, por tanto, se comportan fenotípicamente como una talasemia. En estos casos, el defecto cuantitativo puede producirse por:

- *Síntesis en menor cantidad*: Se han descrito mutaciones en los exones que no interfieren en la traducción sino en el procesamiento del ARNm al formarse nuevas zonas de consenso del *splicing* y que, incluso, si condicionan la formación de un nuevo codón con sentido, darán lugar a este tipo de hemoglobinopatías estructurales, como por ejemplo la Hb E.

- *Fusión de genes*: en el cluster β , por un entrecruzamiento no homólogo entre el gen δ y β dando lugar a un gen que va a codificar una cadena híbrida con el extremo 5' de la cadena delta y el extremo 3' de la cadena beta. Esta cadena puede formar un tetrámero con las cadenas α que recibe el nombre de Hb Lepore, y que presenta una expresión mucho menor porque la zona promotora corresponde al gen delta que se expresa mucho menos que el gen β .

- *Variantes hiperinestables*: aquí el déficit cuantitativo no está relacionado con la disminución o ausencia de síntesis de cadena, sino que es debido a la extremada inestabilidad de la cadena variante que precipita en los precursores eritroides. El interés de este último grupo de talasemias postraduccionales radica en que, a diferencia del resto de talasemias, donde la herencia sigue un patrón recesivo, en

este tipo de talasemias el patrón es dominante presentando un cuadro de talasemia intermedia en estado heterocigoto (*Thein et al, 2005*).

En las β -talasemias existen otros moduladores genéticos como son el genotipo α y el grado de síntesis de Hb F, que pueden modificar el desequilibrio de cadenas que constituye el hecho fisiopatológico más importante y que van a determinar el grado de expresión de la enfermedad. La reducción cuantitativa de β -globina tiene como consecuencia el acúmulo de cadenas de α -globina en exceso, que son las responsables de la fisiopatología de esta entidad (*Thein et al, 2005*). Por lo tanto, la severidad del fenotipo de estos individuos está muy relacionada con el grado de desequilibrio entre la síntesis de cadenas α y no- α , y con el tamaño del *pool* de cadenas α libres.

De esta forma, a mayor desequilibrio entre cadenas α y no α , mayor expresión fenotípica:

- La existencia de la asociación de una triplicación o cuadruplicación de genes α en uno o los dos alelos va a determinar un mayor desequilibrio entre cadenas α y no α y por tanto una expresión más severa. Y al contrario, la asociación de una α -talasemia, al disminuir la síntesis de cadenas α , disminuirá la expresión de la enfermedad.
- De forma inversa, el aumento de la Hb F disminuye el desequilibrio entre cadenas α y no α y por tanto atenúa la expresión fenotípica (*Thein et al, 2013*).

Por tanto, en la β -talasemia existe una gran heterogeneidad molecular que en el caso de las β -talasemias intermedias se refleja en una gran variabilidad de las posibles combinaciones a nivel molecular (Tabla 2) y en su expresión fenotípica (*Galanello et al, 2010*).

Tabla 2. Bases moleculares de la β -talasemia intermedia.

Homocigosis o doble heterocigocia para genes β^+ talasémicos
Combinación de un gen β^0 talasémico con un β^{++} (β -talasemia silente)
Presencia de factores genéticos que aumentan la producción de cadenas γ de globina: <ul style="list-style-type: none">– $\delta\beta$-talasemia– persistencia hereditaria de Hb F
β -talasemia heterocigota asociada a una triplicación de genes α ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$ o $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$)
Variantes de hemoglobina inestables en estado heterocigoto (β -talasemia dominante)
Homocigosis o doble heterocigosis para genes β^+ ó β^0 talasémicos asociados a α -talasemia

Es muy importante poder identificar portadores de β -talasemia, con el fin de realizar un consejo genético adecuado para evitar, en la medida de lo posible, la aparición de homocigotos (β -talasemia mayor) o dobles heterocigotos. Los pacientes con β -talasemia mayor tienen anemia grave, esplenomegalia y alteraciones esqueléticas importantes desde edades muy tempranas.

2. 1. 2. 2. ALFA TALASEMIA

A diferencia de las β -talasemias, la mayoría de las alteraciones moleculares de la α -talasemia son deleciones que pueden afectar a un gen alfa, a los dos genes alfa, a todo el cluster alfa e incluso a todo el telómero del brazo corto del 16, siendo con diferencia más frecuentes las que afectan a un solo gen. Las deleciones que afectan a un solo gen son debidas a una recombinación recíproca desigual entre segmentos homólogos y, dependiendo del segmento donde se produce el punto de corte de la recombinación, se produce la pérdida de 3,7 Kb ($-\alpha^{3.7}$) o de 4,2 Kb ($-\alpha^{4.2}$) en un alelo y la ganancia en el otro de 3,7 Kb ($\alpha\alpha\alpha^{3.7}$) y de 4,2 Kb ($\alpha\alpha\alpha^{4.2}$) (*Hunt et al, 1980; Wasi et al, 1964; Hess et*

al, 1984). También hay descritas otras deleciones algo más cortas de 3,5 y 5,3 Kb (*Higgs et al, 1983A; Embury et al, 1980; Kulozik et al, 1988; Lacerra et al, 1991*).

El resto de deleciones de mayor tamaño que abarcan a los dos genes alfa no parece que se haya originado por recombinaciones entre segmentos homólogos, y se denominan reordenamientos ilegítimos. Estos reordenamientos ilegítimos se pueden producir por roturas y uniones aleatorias, roturas y reparaciones del telómero y por recombinaciones entre secuencias Alu repetitivas (*Higgs, 2013*).

Sólo una minoría de las α -talasemia, en torno al 10%, es debida a mutaciones puntuales, inserciones o deleciones de pocos pares de bases, denominándose en estos casos α -talasemia no deleción. Hasta la actualidad se han descrito más de 70 tipos diferentes de α -talasemia no deleción. La mayoría afectan al gen α_2 y pueden afectar al procesamiento del ARN o la traducción sin que se haya descrito hasta el momento ninguna mutación en los promotores de los genes alfa. La mayoría de estas mutaciones son privativas de pocas familias salvo algunas de ellas, que se presentan con relativa frecuencia en determinadas poblaciones (*Fucharoen et al, 2012; Higgs, 2013*).

La severidad del fenotipo α -talasemia se relaciona proporcionalmente con el número de genes afectados y el grado en que la mutación específica disminuye la expresión del gen afectado. Por tanto, la expresión de las α -talasemias no deleción que afectan al gen α_2 son más graves que las que afectan al gen α_1 y a las α deleción, ya que el gen α_2 se expresa entre 2-3 veces más que el gen α_1 . Esto se va traducir en una mayor microcitosis e hipocromía tanto en los casos heterocigotos como homocigotos, así como un mayor grado de anemia en la enfermedad de la Hb H con el determinante α^+ talasemia heterocigota no deleción (*Higgs, 2013*).

2. 1. 2. 3. DELTA-BETA TALASEMIA

Cuando la delección del gen β se acompaña de una delección simultánea del gen δ se produce una $\delta\beta$ -talasemia. Esta forma de talasemia obedece a deleciones extensas que implican el cluster de β -globina y eliminan los dos genes δ y β , dejando intacto uno o los dos genes γ , por lo que se produce una síntesis compensadora de Hb F (*Supan et al, 2002*). Cuando la delección afecta únicamente a los genes δ y β , la Hb F contiene los 2 tipos de cadenas γ ($G\gamma A\gamma$), y cuando además elimina el gen $A\gamma$, sólo contiene cadenas $G\gamma$ ($A\gamma\delta\beta^0$ -talasemia) (*Trent et al, 1984*). Se han encontrado individuos portadores de mutaciones que producen $\delta\beta$ -talasemia en diferentes grupos étnicos, como por ejemplo turcos, alemanes, japoneses, negros, italianos y españoles. En España, la alteración molecular predominante es una delección de tamaño considerable denominada $\delta\beta$ -talasemia Spanish (*Ottolenghi et al, 1982*).

Esta anomalía, en su forma heterocigota, carece de expresividad clínica, salvo por un pequeño grado de microcitosis, hipocromía y anisocitosis, y su característica más común es la persistencia de síntesis de Hb F durante la etapa adulta (*Weatherall et al 2001*). Estudios realizados en cadenas de globina han demostrado que el desequilibrio entre cadenas α y no α en la $\delta\beta$ -talasemia heterocigota es menos marcado que en la β -talasemia heterocigota (*Kinney et al, 1978*).

Los individuos homocigotos, dado que carecen de genes δ y β , no pueden sintetizar ni Hb A₂ ni Hb A, por lo que la Hb F supone el 100% de la Hb. Clínicamente, se comporta como una talasemia intermedia.

2. 1. 3. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS TALASEMIAS

Su mayor prevalencia está centrada en las regiones que han sido endémicas para la malaria que incluyen el área mediterránea, norte de África, Oriente Medio, India, sudeste de Asia y sur de China.

La α -talasemia es especialmente prevalente en el sudeste asiático, y también en poblaciones del África subsahariana. Se ha observado, así mismo, que el haplotipo α^+ ($-\alpha/$) es mucho más frecuente en la cuenca del Mediterráneo, mientras que el α^0 es más común en el Sudeste Asiático, Oriente Medio e Indonesia. Esto justifica que los casos de Hb H ($-\alpha/--$) y, más aún, los de *hidrops fetalis* que se observan en pacientes asiáticos, sean más raros en individuos nacidos en países del área mediterránea.

La β -talasemia predomina en países de la cuenca mediterránea (Grecia, regiones costeras de Turquía, algunas partes de Italia sobre todo el sur, Sicilia, Cerdeña, Malta, Córcega, Chipre y Creta).

Los cambios migratorios transcontinentales acontecidos en las últimas décadas en nuestro país han supuesto un notable incremento de la prevalencia de estas alteraciones tanto en sus formas leves (heterocigotos) como en sus formas severas (homocigotos y dobles heterocigotos), pasando de ser una rareza a formar parte cada vez con mayor frecuencia de la práctica clínica habitual (*González et al, 2002*).

2. 1. 3. 1. Prevalencia de la β -talasemia en España

En España, la β -talasemia tiene una distribución muy heterogénea entre las diferentes regiones. En un estudio llevado a cabo en 1986 por el Grupo de Estudio de Hemoglobinopatías y Talasemias (GEHBTA) mediante análisis hematimétricos (microcitosis) y de hemoglobinas (Hb A₂) (protocolo GEHBTA II) en 25000 individuos de diferentes regiones de España, se detectó una amplia heterogeneidad en la tasa de

prevalencia de esta patología, que oscila desde la ausencia de la misma en población vasca hasta el 5% detectado en la isla de Menorca (*Grupo de Estudio de Hemoglobinopatías y Talasemias, 1986*). Esta heterogeneidad ha sido confirmada en otros estudios limitados a áreas concretas de la península, como por ejemplo el efectuado en las Islas Canarias en la población de origen Shindi, donde se encontró la mayor tasa registrada de prevalencia de β -talasemia con un 10,5% (*Malcorra et al, 1993*). Además, un estudio realizado durante diez años en población escolar de Menorca, reflejó una prevalencia de β -talasemia del 2,67% (*Oliva Berini et al, 1998*). En la región del Norte de Extremadura sobre una población de 2.818 escolares se observó una prevalencia de β -talasemia del 0,53% (*Martín Núñez et al, 1995*). En la provincia de Huelva también se realizó un estudio sobre mujeres embarazadas de diferentes hospitales, que mostró una prevalencia del 0,81% (*Benito et al, 1996*).

En resumen, a pesar de que solamente existe un único estudio global que abarque a todo el país, los estudios efectuados en diferentes áreas geográficas presentan una prevalencia promedio del 0,4%, lo que supone 1 paciente talasémico por cada 250 habitantes. Esta prevalencia es menor a la detectada en otros países de la cuenca mediterránea, que presentan prevalencias superiores al 2%, habiéndose encontrado las máximas prevalencias en las islas de Cerdeña y Chipre y en Grecia con un 13 y 18%, respectivamente (*Cao et al, 1989*).

En España existen pocos casos de formas severas (talasemia mayor y talasemia intermedia) en comparación con otros países o comarcas de la cuenca mediterránea. No obstante, es de esperar que en un futuro próximo el mapa de distribución geográfica de las β -talasemias y sus tasas de prevalencia sufran los impactos de las

corrientes migratorias de población norteafricana que nuestro país está experimentando en los últimos años. Además, estos cambios pueden determinar una variación en el espectro de las mutaciones encontradas a nivel molecular, lo que tiene implicaciones diagnósticas sobre todo en situaciones en que se plantee un diagnóstico prenatal.

2. 1. 3. 2. Prevalencia de la α -talasemia en España

La gran variabilidad en la expresión fenotípica de la α -talasemia, que comprende desde casos silentes a formas incompatibles con la vida, está en gran medida determinada por su complejidad molecular, y dificulta el conocimiento de la prevalencia real de este tipo de talasemia. Por ejemplo, la pérdida de un solo gen α apenas tiene repercusiones hematológicas (Hb casi siempre es normal, mientras que VCM y HCM suelen estar en el límite de la normalidad) considerándose estas formas como *talasemias silentes o subsilentes*.

En dos estudios realizados en España en los que se estudió la presencia de Hb de Bart sobre más de 2000 muestras de sangre de cordón umbilical se observó una prevalencia de α -talasemia inferior al 0,5% (*Calero, 1985; Calero et al, 1987*). Sin embargo, esta prevalencia fue mayor cuando se aplicaron métodos moleculares sobre el ADN de sangre de cordón umbilical de recién nacidos en lugar de técnicas hematimétricas, encontrándose prevalencias que, según los estudios, oscilaban entre el 1,25% y 2,2% (*De las Nieves et al, 1989; Villegas et al, 1992*).

En un estudio realizado en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid sobre 689 muestras de sangre de cordón umbilical por técnicas de biología molecular se encontró una

prevalencia global de α -talasemia del 4,79%, de α^+ -talasemia heterocigota del 4,49%, de α^0 -talasemia 0,29% y de triplicación de genes α del 0,72% (Sánchez, 1997).

Los estudios realizados reflejan que la prevalencia de α -talasemias en España detectada mediante procedimientos moleculares es comparable con las prevalencias encontradas en otros países o comarcas de la cuenca mediterránea. En un estudio realizado en Italia se estimó una prevalencia de alelos alfa-talasémicos del 2,5% (Velati *et al*, 1986), y en los estudios efectuados en Sicilia y Turquía se observaron prevalencias del 1,2% y 2,2% respectivamente (Fei *et al*, 1989). No obstante, existen otras regiones tales como las islas de Chipre o Cerdeña, en donde las tasas de prevalencias de α -talasemia alcanzan las cotas más elevadas de los países mediterráneos con el 7% y 18% respectivamente (Pirastu *et al*, 1982), pero que no llegan a alcanzar las tasas observadas en la India, sudeste de Asia y Oceanía donde en algunas zonas se alcanzan prevalencias cercanas al 80% (Flint *et al*, 1986; Fodde *et al*, 1991).

No obstante, la mayoría de los estudios mencionados hacen referencia a la prevalencia de la α^+ -talasemia en sus formas heterocigota y homocigota, existiendo poca información sobre la incidencia real de las formas de α^0 -talasemia, que son las que en estado homocigoto o en combinación con un alelo α^+ van a determinar las formas graves de la enfermedad: *hidrops fetalis* por Hb Bart y enfermedad de la Hb H.

Un estudio sobre 536 individuos con alfa talasemia reveló la siguiente distribución en subgrupos: 335 individuos con pérdida de un gen (315 con delección $\alpha^{-3.7}$, 5 con $\alpha^{-4.2}$, 15 con α -talasemia no delección), 114 individuos con pérdida de 2 genes alfa de distintos cromosomas (112 $\alpha^{-3.7}/\alpha^{-3.7}$, 1 $\alpha^{-3.7}/\alpha^{-4.2}$, y 1 homocigoto para mutación en el codón de

iniciación del gen α_1), 72 individuos con pérdida de 2 genes alfa en el mismo cromosoma (α^0 -talasemia heterocigota), y 15 pacientes con Hb H (*Villegas et al, 1998A*).

En 2001, Villegas y colaboradores reportaron su experiencia en el estudio de α -talasemia. De un total de 1264 casos en los que realizaron estudio molecular, se obtuvieron los siguientes diagnósticos: 911 α^+ -talasemia heterocigota (872 con $\alpha^{-3.7}$; 14 con $\alpha^{-4.2}$; 2 con delección de 3.5 Kb, y 23 con α -talasemia no delección), 233 α^+ -talasemia homocigota [223 ($\alpha^{-3.7}/\alpha^{-3.7}$); 1 ($\alpha^{-4.2}/\alpha^{-4.2}$); 6 ($\alpha^{-3.7}/\alpha^{-4.2}$); 1 ($\alpha^{-3.5}/\alpha^{-3.7}$); 1 $\alpha\alpha$ (Nco)/ $\alpha\alpha$ (Nco); 1 α (Hph)/ α (Hph)], 100 α^0 -talasemia heterocigota (18 de ellos eran padres de niños con enfermedad por Hb H), y 25 con triplicación de genes α (16 de los cuales estaban asociados a β -talasemia) (*Villegas et al, 2001*).

2. 2. HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES

Las hemoglobinopatías estructurales o Hb variantes son trastornos hereditarios en los que se produce la síntesis de una cadena de globina anormal. Hasta la actualidad se han descrito unas 1500 variantes estructurales de la Hb (*Giardine et al, 2014*). En la inmensa mayoría de ellas (más del 95%), la alteración se produce por la sustitución de un solo aminoácido (*Huisman et al, 1993*). La delección o inserción de uno o pocos nucleótidos constituye un mecanismo molecular mucho menos frecuente que las mutaciones puntuales.

Dependiendo de la naturaleza y la localización del aminoácido sustituido se van a determinar cambios en la estabilidad, solubilidad y función (afinidad por el O₂) de la

molécula de Hb, que son finalmente los responsables de las manifestaciones clínicas de las Hb variantes (*Hardison et al, 2002*).

La gran mayoría de estas mutaciones se han detectado mediante electroforesis de zona a pH alcalino. El resto de mutaciones se sitúan en el interior de la molécula y casi siempre en las zonas de contacto entre subunidades (Hb inestables) o en regiones próximas a la cavidad del Hemo (Hb con alteración de la afinidad por el O₂ y Hb M). A diferencia de las mutaciones superficiales, las mutaciones internas pueden no acompañarse de variación en la carga eléctrica de la molécula y, por tanto, deben ser detectadas por procedimientos diferentes a la electroforesis.

Las Hb variantes se denominan de acuerdo con la cadena afectada, el número secuencial del aminoácido mutado (con su correspondiente segmento helicoidal) y la naturaleza de la mutación. Por ejemplo, la Hb S se denomina Hb S 6(A3) Glu→Val. La Hb S fue la primera variante de Hb en ser descubierta (*Pauling et al, 1949*) y la primera en la que se conoció el aminoácido sustituido (*Ingram et al 1956*).

2. 2. 1. CLASIFICACIÓN

Podemos establecer una clasificación clínica de las hemoglobinopatías estructurales:

1. Asintomáticas
2. Anemia Hemolítica
 - A. Síndrome de Falciformación (S/S, S/C, S/O, S/D, S/β-tal)
 - B. Hemoglobinas inestables
3. Poliglobulia (Hemoglobinas con alta afinidad por el O₂)
4. Cianosis Familiar
 - A. Hemoglobinas con baja afinidad por O₂

B. Hemoglobinas M → Metahemoglobinemia

5. Variantes estructurales que se expresan con fenotipo talasémico

A. Fenotipo de talasemia β

- Fusión de genes
- Procesamiento anormal del ARNm
- Inestabilidad extrema

B. Fenotipo de talasemia α

- Mutaciones en el codón de terminación de la cadena.
- Inestabilidad extrema.

2. 2. 2. HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES COMUNES

Se denominan hemoglobinopatías estructurales comunes aquellas cuya prevalencia supera el 1% en determinadas áreas geográficas.

2. 2. 2. 1. Hemoglobina S

Es la hemoglobinopatía estructural más frecuente en el mundo. Afecta a millones de individuos en África tropical y subtropical, península arábig, India, América Central y Estados Unidos. La Hb S (beta 6 Glu→Val) se produce por la sustitución de un residuo de ácido glutámico por un residuo de valina en la posición 6 de la cadena de beta-globina (*Ingram et al, 1956*).

Además de la más frecuente, es la de mayor repercusión clínica ya que en homocigosis causa Anemia Falciforme o Anemia Drepanocítica, y la doble heterocigosis con otras Hb variantes o con β -talasemia produce cuadros clínicos de gravedad parecida.

Como consecuencia de la mutación, cuando la Hb se desoxigena, sufre un proceso espontáneo de polimerización formando un gel cristalino. Cada polímero está formado por 14 haces longitudinales de desoxi-Hb que se disponen formando un cuerpo tactoide, una estructura cilíndrica insoluble y rígida. Debido a estos polímeros, se rompe el citoesqueleto del eritrocito, adoptando esta la forma característica del drepanocito (*Eaton et al, 1990; Kaul et al, 1989*).

Aunque el fenómeno de la falciformación es reversible, entre el 5 y el 50% de los eritrocitos falciformes no consiguen recuperar su forma original, siendo eliminados por el sistema mononuclear fagocítico. Por otra parte, los eritrocitos alterados presentan un descenso del volumen corpuscular y un gran aumento de la concentración de Hb. Esto es debido a que la desoxi-Hb induce alteraciones de la membrana eritrocitaria (modificación de la composición y distribución de los fosfolípidos en la bicapa) que se traducen en una importante deshidratación. Adicionalmente, los drepanocitos exhiben una gran tendencia a adherirse al endotelio vascular favoreciendo la formación de microtrombos y oclusiones vasculares periféricas.

La hemoglobinopatía S homocigota cursa con anemia hemolítica crónica y amplia variedad de eventos vasooclusivos y sus consecuencias, acompañados de una mayor predisposición a infecciones, con importante morbilidad y mortalidad tempranas (*Bunn et al, 1997; Bainbridge et al, 1985*). Entre las complicaciones agudas que presentan estos pacientes destacan las crisis vasooclusivas que producen dolor de gran intensidad, accidentes cerebrovasculares agudos, síndrome torácico agudo, secuestro esplénico, priapismo, crisis hiperhemolíticas o infecciones. Además, también van a desarrollar complicaciones a largo plazo como por ejemplo daño renal, problemas oculares, colelitiasis, hepatitis crónica, patología ósea (osteonecrosis, hiperplasia de

médula ósea que puede llegar a producir osteoporosis o fracturas patológicas), úlceras en las piernas, retraso del crecimiento y de la maduración sexual, complicaciones cardiovasculares (cardiomegalia, insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial o daño pulmonar.

2. 2. 2. 2. Hemoglobina C

La segunda en frecuencia a nivel mundial es la Hb C (beta 6 Glu→Lys), en la que se produce la sustitución de un residuo de lisina en lugar de un residuo de ácido glutámico en la posición 6 de la cadena de beta-globina. Predomina en zonas del oeste de África, y en zonas con grandes focos migratorios procedentes de dicha región.

Es menos soluble que la Hb A, y forma cristales hexagonales en lugar de los largos polímeros que forma la Hb S en estado de homocigosis o doble heterocigosis (Hirsch et al, 1985). Y lo que es más importante: la Hb C produce deshidratación de los hematíes, produciendo aumento de CHCM, es decir, hipercromía (Bunn et al, 1982; Fabry et al, 1982; Brugnara et al, 1985).

Los pacientes con Hb C heterocigota (HbAC) son fenotípicamente normales o con mínima hipercromía, mientras que los individuos con enfermedad por Hb C o hemoglobinopatía C homocigota (HbCC) tienen un leve grado de hemólisis y esplenomegalia, así como una anemia leve. Además de la presencia de cristales, los individuos HbCC tienen muchos dianocitos en el frotis de sangre periférica (Kim et al, 1980). En la forma homocigota, los pacientes no presentan falciformación ni eventos vasooclusivos.

La presencia de esta mutación no protege contra la malaria leve, aunque sí frente a las formas graves de enfermedad (Agarwal et al, 2000).

Los dobles heterocigotos para Hb S y Hb C tienen riesgo de presentar las mismas complicaciones que los homocigotos para Hb S pero con una menor frecuencia. Sin embargo, el curso clínico de la hemoglobinopatía SC es más leve. (Bunn et al, 1982; Fabry et al, 1982; Ballas et al, 1987; Lawrence et al, 1991). Tienen un 50% menos de crisis vasooclusivas (Platt et al, 1991), menor riesgo de infartos silentes (Ohene-Frempong et al, 1998), menor incidencia de infecciones fatales en la infancia (Buchanan et al, 1983), desarrollan osteonecrosis más tarde (Milner et al, 1991), una esperanza de vida media veinte años mayor (Platt et al, 1994), aunque una mayor incidencia de retinopatía (Condon et al, 1980).

2. 2. 2. 3. Hemoglobina D

La Hb D más común, Hb D-Los Ángeles (también llamada Hb D-Punjab) (beta 121 Glu→Gln) se produce por la sustitución de un residuo de ácido glutámico por un residuo de glutamina en la posición 121 de la cadena de beta-globina.

Los sujetos con Hb D heterocigota son asintomáticos, sin anemia, con índices corpusculares normales. Los homocigotos para Hb D (HbDD) sólo tienen alteraciones muy leves del hemograma, con aumento de dianocitos en el frotis (*Adekile et al, 1996*).

Los casos de doble heterocigosis para Hb D y Hb S (HbSD) tienen enfermedad severa, con manifestaciones clínicas similares a los pacientes con hemoglobinopatía S homocigota (HbSS).

2. 2. 2. 4. Hemoglobina E

Esta Hb variante (beta 26 Glu→Lys) se produce por la sustitución de un residuo de ácido glutámico por un residuo de lisina en la posición 26 de la cadena de beta-globina. En cuanto a su distribución geográfica, la encontramos fundamentalmente en India y, sobre todo, el sudeste asiático, donde su prevalencia se acerca al 60%. Esta mutación activa una zona críptica de *splicing* en el primer codón del gen beta, produciéndose un *splicing* alternativo y una expresión disminuida de la síntesis de cadenas de globina (por lo que presenta un fenotipo talasémico) (*Orkin et al, 1982*), siendo además levemente inestable al daño oxidativo (*Macdonald et al, 1983*).

Los heterocigotos (HbAE) no suelen presentar anemia, pero sí tienen un mínimo grado de microcitosis e hipocromía. En los individuos homocigotos (Enfermedad por hemoglobina E, HbEE) se observa anemia leve con microcitosis e hipocromía importantes, así como numerosos dianocitos (*Vichinsky et al, 2007*).

Un fenotipo con mucha mayor severidad clínica se observa cuando esta mutación se combina con otras hemoglobinopatías [por ejemplo, con Hb S (HbSE) o con beta talasemia] (*Carnley et al, 2006; Tritipsombut et al, 2012*).

2. 2. 2. 5. Hemoglobina O-Arab

La Hb O-Arab (beta 121 Glu→Lys) se produce por la sustitución de un residuo de ácido glutámico por un residuo de lisina en la posición 121 de la cadena de beta-globina (*Ramot et al, 1960*).

Fue descrita por primera vez en una familia árabe de Israel, pero su distribución geográfica es muy amplia. Los heterocigotos son asintomáticos, mientras que los homocigotos suelen tener leve anemia hemolítica compensada (*Joutovsky et al, 2004*).

Esta Hb variante tiene interés clínico ya que su asociación con Hb S (individuos HbSO-Arab) produce un cuadro clínico y alteraciones de laboratorio muy similares a los que se encuentran en pacientes HbSS (*Zimmerman et al, 1999*).

2. 2. 3. PREVALENCIA DE HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES EN ESPAÑA

A partir de finales de la década de los 80 y principios de los 90 se ha producido una importante inmigración a España y a otros países europeos occidentales de habitantes de las regiones más deprimidas y con menos expectativas del planeta (África subsahariana, Magreb, Latinoamérica, sudeste asiático y Este de Europa) (*Piel et al, 2014; González et al, 2002*). Dichos movimientos migratorios se concentran especialmente en los grandes núcleos urbanos. Todos estos cambios étnicos pueden producir el desarrollo de una gran heterogeneidad de patologías y lesiones moleculares de la Hb, con la aparición de variantes estructurales en poblaciones carentes de ellas o cuya frecuencia era muy baja antes de la migración transcontinental.

Respecto a la incidencia de hemoglobinopatías estructurales en España, solamente hay 4 estudios publicados antes de la era de la inmigración, sobre sangre de cordón umbilical y en los cuales se utilizaron técnicas electroforéticas como método de despistaje. Uno realizado en Barcelona sobre 3.600 muestras, obteniéndose una incidencia de 1,38 por mil (*Baiget et al, 1981*), otro en Granada en población no gitana cuya incidencia fue de 1,25 por mil (*De Pablos et al, 1988*), otro en la Alta Extremadura sobre 4.750 cordones con una incidencia de 1,47 por mil (*Martín et al, 1998*) y otro en la Bahía de Cádiz con una incidencia de 1,39 por mil (*Risueño et al, 1995*).

En las últimas dos décadas se han producido importantes movimientos migratorios hacia nuestro país desde países con elevada prevalencia de estas alteraciones. Hasta la fecha se han publicado numerosos estudios sistemáticos de cribado neonatal de hemoglobinopatías.

En el primero, que incluyó un total de 82 recién nacidos subsaharianos y afrocaribeños, la prevalencia de portadores de Hb S o Hb C fue del 10,98% (*Cabot et al, 1998*).

En el segundo trabajo, se analizaron 4020 muestras de recién nacidos, de las cuales 2439 pertenecían a población inmigrante (93 de ellas eran portadoras de variante estructural, lo que equivale a una prevalencia de 1 caso por cada 26 muestras analizadas) y 1581 eran de población autóctona (no se encontró Hb variante en ninguna de ellas) (*Mañú-Pereira et al, 2006*).

En el tercer estudio, llevado a cabo por los mismos autores del anterior, se analizaron 258 muestras de población inmigrante subsahariana mediante HPLC, y se encontraron 49 casos de Hb S (18,2%), 10 de Hb C (3,7%), 5 de anemia falciforme (1,8%) y una variante no identificada (0,37%) (*Mañú-Pereira et al, 2007*).

En un estudio en el que se realizó HPLC a 29253 neonatos de la Comunidad de Madrid, la prevalencia de Hb variantes fue de 1 caso por cada 303 muestras (*Dulín Iñíguez et al, 2003*).

El quinto estudio, realizado en neonatos vivos de la Comunidad Autónoma de Madrid reflejó que, en 151 inmigrantes africanos, un 30,8% fueron muestras patológicas (*Joyanes et al, 2006*).

En Extremadura se llevó a cabo el sexto de los estudios mencionados, sobre 4750 muestras, mediante cribado universal y electroforesis alcalina, y se detectó 1 caso de

Hb variante por cada 681 muestras (*Programa de salud pública de la Junta de Extremadura Subunidad de errores congénitos del metabolismo*).

En el Hospital Clínico San Carlos de Madrid se realizó un séptimo estudio en los recién nacidos mediante HPLC de fase reversa, encontrándose una incidencia de 11,7 por mil, es decir diez veces superior a la publicada por los primeros estudios en España (*González et al, 2002*). Este notable incremento estuvo claramente determinado por el elevado porcentaje de neonatos hijos de inmigrantes (38,2%). La incidencia en el grupo de extranjeros fue de 28,3 por mil y de 5,4 por mil en el grupo de españoles.

Calvo-Villas y colaboradores estudiaron a 2436 mujeres embarazadas, y encontraron una incidencia de hemoglobinopatías estructurales en estado heterocigoto de 9,44 por mil (*Calvo-Villas et al, 2006*).

Por su parte, Las Heras Manso y colaboradores realizaron el primer estudio en población inmigrante adulta. En él estudiaron muestras de 204 inmigrantes, de las cuales 160 fueron normales y 44 eran portadores de una Hb variante (*Las Heras Manso et al, 2008*).

En un estudio realizado en el Hospital Nuestra Señora de Candelaria, en Tenerife, se reportaron todas las hemoglobinopatías (estructurales y talasemias) diagnosticadas durante un año. Se diagnosticaron 198 hemoglobinopatías: 71 β -talasemias heterocigotas, 2 β -talasemias intermedias, 70 Hb S en estado heterocigoto (HbAS), 2 Hb S en estado homocigoto (HbSS), 1 doble heterocigoto β -talasemia/HbS, 30 Hb D en estado heterocigoto (HbAD), 18 Hb C en estado heterocigoto (HbAC), 2 Hb G en estado heterocigoto (HbAG), 1 HbE en estado heterocigoto (HbAE) y 1 Hb J Birmingham en estado heterocigoto (HbAJ) (*de las Heras Flórez et al, 2008*).

Más recientemente, de la Iglesia Iñigo y colaboradores estudiaron a 200 inmigrantes recién llegados a Gran Canaria, y encontraron que 26 de ellos (13%) eran portadores de una hemoglobinopatía estructural (*de la Iglesia Iñigo et al, 2013*).

La variante de Hb más prevalente en España es la Hb S según todos los estudios referidos. En segundo lugar se encuentra la Hb C y en tercer lugar la Hb D; esto se ha visto en todos los trabajos anteriormente mencionados salvo en el realizado por de las Heras Flórez y colaboradores, en el que hubo más portadores de Hb D que de Hb C.

3. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DE HEMOGLOBINOPATÍAS

El diagnóstico de las hemoglobinopatías requiere una integración de manifestaciones clínicas, parámetros hematológicos y análisis de cadenas de globina (*Ryan et al, 2010*). Combinar estos elementos permite lograr un diagnóstico adecuado, gracias al cual podremos tratar la anemia que pueden presentar algunos de estos pacientes, proporcionar un consejo genético adecuado para una prevención primaria y prevenir o aminorar las complicaciones a largo plazo de los pacientes homocigotos o dobles heterocigotos mediante un tratamiento precoz.

La elección de la técnica o técnicas a emplear en cada laboratorio debe basarse en el volumen de muestras procesadas diariamente, el tipo de muestras con las que se va a trabajar (sangre líquida o gotas de sangre seca), disponibilidad, costes y la experiencia del personal encargado de realizar los estudios (*Ryan et al, 2010*).

3. 1. NIVELES DIAGNÓSTICOS DE HEMOGLOBINOPATÍAS

Dentro del estudio de hemoglobinopatías, podemos hablar de 3 niveles diagnósticos.

-PRIMER NIVEL, DE SOSPECHA. Desde un punto de vista clínico es importante recoger en la historia clínica la edad de comienzo, la raza, el tiempo de instauración, la toma de medicamentos, los antecedentes familiares, antecedentes de abortos o *hidrops fetalis*, malformaciones somáticas y manifestaciones extra-hematológicas que nos pueden orientar en el diagnóstico del tipo y la severidad de la talasemia. Además de estos datos, las herramientas que emplearemos para sospechar una hemoglobinopatía son los parámetros del hemograma y representaciones gráficas de los analizadores hematológicos, y, por último, morfología del frotis de sangre periférica. Estas pruebas, por sí mismas, no son suficientes para establecer un diagnóstico, pero sí sirven para llamar la atención sobre muestras que podrían corresponder a hemoglobinopatías y sobre las que habría que realizar estudios adicionales.

La microcitosis y la hipocromía constituyen marcadores diagnósticos de la talasemia, que se correlacionan con el grado de reducción de síntesis de la cadena deficitaria y que se ponen de manifiesto en los analizadores hematológicos por una disminución en el volumen corpuscular medio (VCM) en el caso de la microcitosis, y por una disminución en la Hb corpuscular media (HCM) y en la concentración de Hb corpuscular media (CHCM) en el caso de la hipocromía.

-SEGUNDO NIVEL, DE PRESUNCIÓN o ALTA PROBABILIDAD. Se basa en pruebas de laboratorio específicas: electroforesis de Hb, HPLC, isoelectroenfoque o electroforesis capilar. Para el diagnóstico de hemoglobinopatía estructural puede ser suficiente con este tipo de pruebas, siendo necesario realizar dos de ellas. Sin embargo, en algunos casos es necesario realizar pruebas diagnósticas del tercer nivel. Tanto la beta como la delta-beta talasemias pueden ser diagnosticadas con este tipo de técnicas, mientras

que para el diagnóstico de alfa talasemia no existen técnicas específicas a nivel de proteína y es imprescindible realizar estudios moleculares.

- En las ***β-talasemias homocigotas*** β^0/β^0 no existe Hb A y prácticamente la totalidad de la hemoglobina es Hb F. En los casos β^+/β^0 los niveles de Hb A se encuentran entre un 10-30% y la Hb F constituye entre el 70-90%. En los casos de β-talasemia homocigota existe una cantidad variable de Hb A₂ que puede estar dentro de la normalidad.

- Las ***β-talasemias heterocigotas*** se caracterizan por presentar una elevación de Hb A₂ debido a que la disminución de síntesis de cadena β va a permitir que las cadenas delta puedan combinarse con mayor facilidad con las cadenas α. Aunque niveles de Hb A₂ superiores a 3,4 % son un marcador diagnóstico de las β-talasemias, la Hb A₂ puede ser normal en los casos donde la mutación determina una disminución muy leve de la síntesis de cadena β, en los casos con una delta talasemia o una variante estructural de la cadena delta, en casos con ferropenia o en los casos asociados con α talasemia (Stephens et al, 2012).

- Valores de Hb A₂ superiores al 8-9% son indicativos de la existencia de ***variantes de hemoglobina*** que por técnicas de cromatografía se pueden eluir en el mismo tiempo de retención que la Hb A₂ como la Hb Lepore y la Hb E, que también presentan un fenotipo de β-talasemia. Habrá que sospechar la Hb Lepore, cuando la cuantificación sea de un 10-15% y la Hb E cuando la cuantificación sea superior al 20%. En estos casos habrá que recurrir a otras técnicas electroforéticas o moleculares para identificar la Hb variante.

- En las **$\delta\beta$ -talasemias** la ausencia de los genes delta y beta van a determinar una sobreexpresión de los genes gamma y por tanto un aumento de Hb F con Hb A₂ normal que constituye el marcador diagnóstico de estos casos. Sin embargo, en algunos casos (por alteraciones moleculares de los genes gamma o porque la delección engloba zonas reguladoras de la expresión de estos genes gamma) el aumento de Hb F no es muy marcado y habrá que recurrir a estudios moleculares para su diagnóstico (*Ryan et al, 2010*).

- **α -talasemias**: a diferencia de las β talasemias, no hay marcadores a nivel de proteína para realizar el diagnóstico, salvo en la enfermedad de la Hb H en la que se puede detectar la Hb H o la Hb Bart por HPLC o electroforesis o también mediante su precipitación en forma de cuerpos de inclusión en los hematíes. Por tanto, en las α^+ -talasemias bien heterocigotas u homocigotas y las α^0 bien por delección o no delección son necesarios estudios moleculares.

-TERCER NIVEL, DE CERTEZA ABSOLUTA. Consiste en la identificación de la alteración genética a nivel molecular. Es obligatorio si queremos diagnosticar una alfa-talasemia con certeza, ya que en esta patología no disponemos de técnicas específicas de proteína (Hb A₂ y Hb F son normales). Además, se realiza en aquellos casos complejos o cuyos resultados de las pruebas del segundo nivel no son concluyentes.

3. 2. HEMOGRAMA

Conseguir una adecuada interpretación del análisis de cadenas de globina es prácticamente imposible si no se acompaña de la información obtenida del hemograma.

Además del grado de anemia (medido por la Hb), el hemograma nos proporciona información precisa sobre el tamaño de los hematíes (mediante el VCM), su contenido de Hb (HCM), su concentración de Hb (CHCM), y su anisocitosis o cómo de diferentes son los hematíes entre sí (mediante el ancho de distribución eritrocitario o ADE) (Tefferi *et al*, 2005).

Algunos de estos parámetros se obtienen por medición directa (número total de hematíes, Hb, VCM, ADE) mientras que otros se obtienen mediante el cálculo de una sencilla fórmula matemática (hematocrito, HCM, CHCM). El hematocrito se obtiene multiplicando el VCM por el número total de hematíes. La HCM se obtiene dividiendo la cantidad de Hb entre el número total de hematíes. La CHCM se obtiene dividiendo la cantidad de Hb entre el hematocrito. Todos estos son los que podemos considerar parámetros “clásicos” del hemograma.

Mientras que los individuos con talasemia presentan habitualmente anemia microcítica e hipocrómica, la mayoría de portadores de Hb variante son silentes o con cambios mínimos en el hemograma que suelen pasar desapercibidos.

Es imprescindible realizar, junto con el hemograma, un frotis de sangre periférica, ya que ambos proporcionan información complementaria. La combinación de ambos es una herramienta fundamental para el diagnóstico hematológico.

El hemograma debe interpretarse en el contexto clínico del paciente y para ello utilizaremos todas las herramientas que estén a nuestro alcance (antecedentes, historia clínica, datos analíticos, técnicas de imagen, pruebas complementarias).

3. 3. FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA

Lo más característico de la morfología de los hematíes en sujetos portadores de talasemia es la microcitosis, acompañada de hipocromía, con frecuentes dianocitos. En el caso de la beta talasemia heterocigota este cuadro morfológico se acompaña de punteado basófilo (*Ford et al, 2013*).

Los dianocitos o codocitos se producen por un aumento de la relación superficie/volumen del hematíe. En las talasemias hay disminución de volumen por reducción cuantitativa de la Hb intracelular pero la superficie de membrana es la misma: es como si “le sobrara membrana al hematíe”, por lo que adoptan una forma característica de campana.

En pacientes talasémicos predomina la microcitosis frente a la hipocromía (aunque siempre coexisten ambas), mientras que en la ferropenia ocurre el fenómeno opuesto.

Cuando en el frotis nos encontremos una anisopoiquilocitosis marcada, con importante policromatofilia y frecuentes eritroblastos, es improbable que se trate de un simple rasgo talasémico. Dichos hallazgos hacen más probable que estemos ante una talasemia intermedia/mayor (*Ford et al, 2013*).

En pacientes portadores de hemoglobinopatía estructural, el cuadro morfológico es muy poco llamativo. Se pueden observar ocasionales dianocitos y mínima microcitosis, y en muchos casos el frotis de sangre periférica es normal.

En pacientes con hemoglobinopatía S homocigota el cuadro morfológico es muy característico, con abundantes drepanocitos o hematíes con forma de hoz, acompañados de frecuentes dianocitos y policromatofilia. En el frotis de los sujetos

con hemoglobinopatía C homocigota hay un claro predominio de dianocitos, y se pueden observar cristales de Hb C en el interior de algunos hematíes, así como algunos microesferocitos. La morfología que se observa en individuos SC es intermedia entre los SS y los CC: se observan algunos drepanocitos y ocasionales precipitados de cristales de Hb C, además de frecuentes dianocitos (*Lawrence et al, 1991*).

Debemos interpretar los hallazgos citológicos junto con el hemograma, datos clínicos y antecedentes del paciente. El informe final debe ser claro e inteligible y no limitarse a una serie de descripciones citológicas sin llegar a ninguna conclusión.

3. 4. ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINAS

Ha sido el método más comúnmente utilizado para el estudio de hemoglobinopatías tradicionalmente. El *screening* inicial se realiza a pH alcalino (8.6), habitualmente en acetato de celulosa. Con esto podemos separar de forma eficaz Hb normales (Hb A, Hb F, Hb A₂) y las Hb variantes más comunes (Hb S, Hb C).

En la tira de acetato de celulosa, la Hb A es la que migra más rápido desde el ánodo hacia el cátodo, seguida de la Hb F, Hb S y Hb C (figura 5, A). A pesar de tratarse de un método simple, rápido y barato, tiene claras limitaciones. Un número importante de Hb variantes migran a la misma altura que Hb S y Hb C en acetato de celulosa, por lo que la utilidad de esta técnica a pH alcalino es limitada. Entre las variantes que corren a la altura de la Hb S están la Hb D, Hb G Philadelphia y Hb Lepore. Por otro lado, entre las variantes que corren a la altura de la Hb C encontramos la Hb E y la Hb O-Arab (*Huisman, 1993B*).

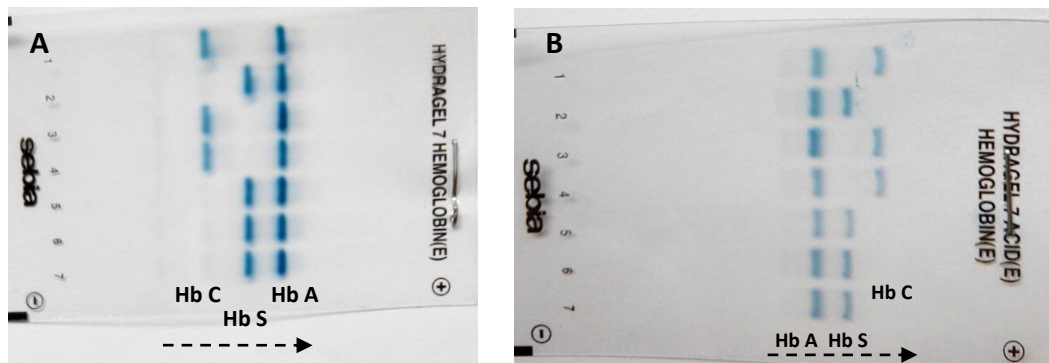


Figura 5. Electroforesis en acetato de celulosa, en medio básico (A) y ácido (B).

Por tanto, es necesario utilizar un segundo procedimiento electroforético en agar citrato y pH ácido para evitar las limitaciones de la co-migración de las diferentes variantes de Hb. Este método no depende sólo de la diferencia de cargas eléctricas, sino que también se basa en la interacción química del medio utilizado en la tira de electroforesis (agar) con las moléculas de Hb de una forma pH-dependiente. Hb A, Hb F, Hb S y Hb C tienen distintos patrones de movilidad en agar citrato a pH ácido, que son diferentes de sus patrones en acetato de celulosa a pH alcalino (figura 5, B). Tanto Hb D como Hb G Philadelphia co-migran con la Hb S a pH alcalino, mientras que a pH ácido lo hacen a la altura de Hb A. En agar citrato, la Hb E corre a la altura de Hb A, mientras que la Hb O-Arab tiene un patrón distinto (entre Hb A y Hb S) (Figura 6).

Por lo tanto, la utilización combinada de electroforesis en acetato de celulosa a pH alcalino y en agar citrato a pH ácido nos ayuda a identificar las hemoglobinopatías estructurales más frecuentes: Hb S, Hb C, Hb E, Hb O-Arab (*Huisman et al, 1993; Trent et al, 2006*). Sin embargo, un mismo patrón electroforético tanto a pH básico como

ácido puede corresponder a más de una Hb variante. Por ejemplo, con este método no podemos diferenciar la Hb D de la Hb G Philadelphia.

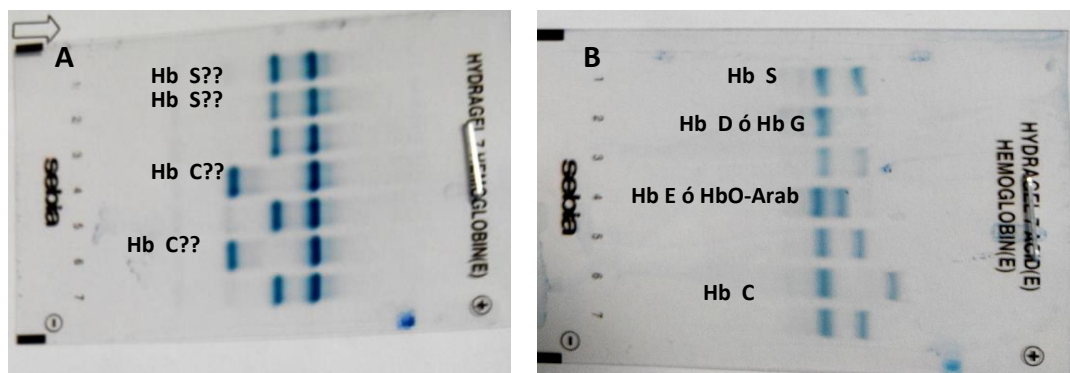


Figura 6. Co-migración de distintas Hb variantes en electroforesis en medio

básico. Si nos fijamos en las Hb variantes 1 y 2, ambas parecen Hb S en medio básico (A), pero en medio ácido (B) se observa distinto patrón electroforético en ambas, siendo la 1 Hb S y la 2 Hb D (o Hb G Philadelphia). Lo mismo ocurre con la 4 y la 6, que parecen ambas Hb C en medio básico, pero en medio ácido (B) se observa que la 4 es una Hb E (ó Hb O-Arab) y la 6 sí es una Hb C.

La identificación de una Hb variante debería ser confirmada por una de las técnicas que se describen a continuación. La razón por la que se recomienda una segunda metodología es que una única banda en la posición electroforética de S ó C podría deberse a una doble heterocigosis para S con D ó G-Philadelphia (HbSD, HbSG), o bien para C con O-Arab ó E (HbCO-Arab, HbCE) (Ryan *et al*, 2010).

3. 5. ISOELECTROENFOQUE

Consiste en una electroforesis en un medio en el que hay un gradiente de pH establecido por la presencia de anfólitos en ese medio. El rango óptimo de pH para detectar hemoglobinopatías está entre 6.0 y 8.0. Este método se aprovecha de la movilidad de las proteínas (en este caso, Hb) basándose en su punto isoeléctrico. Cuando se aplica una corriente eléctrica a un gel de isoelectroenfoque, las Hb variantes

migrarán hacia un pH donde tengan una carga eléctrica en su superficie neutra (punto isoeléctrico). La ventaja de esta técnica es su capacidad para separar variantes de Hb cuyos puntos isoeléctricos difieren por muy poco, tan poco como 0.1 unidades de pH.

El isoelectroenfoque es capaz de discriminar entre Hb D y Hb S, y entre Hb C y Hb E y Hb O-Arab. Además, es una técnica muy sensible para detectar pequeñas cantidades (por ejemplo, menos del 2%) de Hb H (tetrámeros de beta-globina) en individuos con delección de 2 genes de alfa-globina.

A pesar de que esta metodología tiene una mayor resolución que la electroforesis de hemoglobinas con la ventaja de que separa más Hb variantes, también tiene el inconveniente de que separa la Hb en sus derivados post-transcripcionales. Por ejemplo, separa la Hb F en F₁ (acetilada) y F₁₁; la Hb A se puede separar en A₀, A₁, A (α met), A (β met) y A ($\alpha\beta$ met), y de una forma similar para otras hemoglobinas. Esto hace que la interpretación de los resultados sea más difícil. La identificación de Hb variantes es sólo provisional, y un segundo método es necesario.

3. 6. HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) o

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. En la HPLC, el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de lo que se conoce como fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la

columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que van atravesando la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía.

Entre los tipos de HPLC podemos encontrar:

-Intercambio catiónico. Con este método, se puede establecer un diagnóstico positivo de las variantes de cadena β más frecuentes, como son Hb S, Hb C, Hb E, Hb D-Los Ángeles, y Hb O-Arab, además de variantes de cadena α como la Hb G-Philadelphia.

Los datos cuantitativos obtenidos del HPLC también nos permiten realizar el diagnóstico de β -talasemia heterocigota, además de otros síndromes beta (como $\delta\beta$ -talasemia) y PHHF (*Huisman et al, 1993; Kutlar et al, 1986; Kutlar et al 1991*). El dato numérico del porcentaje de Hb variante que nos proporciona el HPLC nos da importantes pistas sobre si la variante en cuestión es de cadena α o β : en la mayoría de casos, las variantes de cadena α suponen entre un 15 y un 25% del total de Hb, mientras que las variantes de cadena β suponen un 30-45%. Sin embargo, hay excepciones a esta regla, incluyendo variantes de Hb inestables y/o la presencia de alfa o beta talasemia concomitante.

-Fase reversa. El siguiente paso, si el diagnóstico no ha quedado claro, es la aplicación de HPLC de fase reversa. Esta técnica es útil para localizar la anomalía en cadenas α o β (y también γ), y también para cuantificar las cadenas G γ y A γ de la Hb F en casos con Hb fetal elevada y por tanto ser de utilidad en el diagnóstico de los diferentes tipos de PHHF y $\delta\beta$ -talasemia (*Huisman et al, 1993; Kutlar et al, 1986; Kutlar et al 1991*).

Las ventajas de la HPLC frente a la electroforesis de hemoglobinas son las siguientes:

1. Los analizadores son automáticos, por lo que requieren menos tiempo por parte de los técnicos de laboratorio y pueden procesar gran cantidad de muestras.
2. Es suficiente con un volumen muy pequeño de muestra para el análisis (5 μ l).
3. En cada muestra se pueden separar y cuantificar tanto las fracciones normales como las variantes (si las hay) de Hb.
4. Se puede realizar identificación de muchos más tipos de Hb variantes.
5. Las variantes de cadena δ se detectan con más facilidad.

3. 7. ELECTROFORESIS/ISOELECTROENFOQUE CAPILAR

Es una técnica para separar las diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo con la relación masa/carga de las mismas. La separación se lleva a cabo en un tubo hueco de diámetro muy pequeño (menos de 50 μ m de diámetro) llamado capilar. Dentro del capilar de separación se encuentran la disolución que contiene los analitos o las moléculas a separar y el tampón o medio electrolítico que es el encargado de conducir la corriente.

Para que la separación según la relación masa/carga de las distintas moléculas sea posible, es necesario aplicar una diferencia de potencial entre los dos extremos del capilar, que hará que las moléculas se muevan hacia un extremo u otro del capilar (movilidad electroforética: las moléculas catiónicas hacia el polo negativo y las aniónicas hacia el polo positivo) y que se vayan separando entre sí.

La resolución de este método es excelente, y comparable a la obtenida con HPLC. La ventaja de esta técnica es su capacidad para analizar 8 canales simultáneamente, permitiendo así procesar múltiples muestras (hasta 34 por hora).

Tanto la electroforesis capilar como el HPLC son las técnicas más sensibles y precisas para el diagnóstico de hemoglobinopatías estructurales y talasemias, con la ventaja añadida de que son técnicas automatizadas (*Fucharoen et al, 2012*).

3. 9. OTRAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

-Test de falciformación. Consiste en inducir la formación de drepanocitos en un ambiente pobre en O₂. No está indicado como herramienta de *screening* inicial salvo en una situación de emergencia. Todos los test positivos deben confirmarse por HPLC u otro método alternativo.

-Cuerpos de Heinz. Son inclusiones eritrocitarias en forma de esférulas azules formadas por precipitados de Hb, que se sitúan en la periferia de los hematíes y que se tiñen de color púrpura con una solución de cristal violeta. La presencia de cuerpos de Heinz no es específica de α -talasemia (enfermedad por Hb H), sino que puede observarse también en enzimopatías (déficit de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), otras causas de estrés oxidativo o Hb inestables.

-Detección de hemoglobinas inestables. Se puede hacer por 2 métodos:

-Test de precipitación con isopropanol. Se basa en la precipitación acelerada de la Hb inestable con el isopropanol.

-Prueba de inestabilidad al calor. El hemolizado de la sangre del paciente y un control normal se calientan a 50°C, y a esa temperatura las Hb inestables precipitan en seguida.

3. 9. TÉCNICAS MOLECULARES

• **Mutaciones puntuales:** el estudio molecular se puede realizar por diferentes técnicas derivadas de la PCR:

- *PCR-ARMS* en la que se utilizan *primers* mutados y no mutados para la mutación que se esté estudiando.

- *PCR-RFLP* en los casos en los que las mutaciones provoquen la aparición o desaparición de zonas específicas de corte determinadas por enzimas de restricción.

- *Amplificación por PCR* de un segmento del gen β , realizando una electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante para determinar si en esos fragmentos hay mutaciones.

- *Secuenciación directa del gen:* se pueden estudiar todas las mutaciones puntuales.

• **Deleciones.** El estudio se puede realizar:

- *Por Southern blot*: utilizando diferentes enzimas de restricción que den lugar a grandes fragmentos de ADN y sondas complementarias para reconocer los fragmentos obtenidos con las enzimas de restricción.

- *Por PCR gap*: utilizando *primers* que flanquean los puntos de corte de las deleciones.

- *Por MLPA*: utilizando múltiples sondas que se pueden unir a diferentes zonas a lo largo del todo cluster y sólo se amplifican si se han unido a estas zonas específicas (Harteveld et al, 2010).

• **Utilidad del estudio molecular**: no sólo nos va confirmar la presencia de una forma severa (talasemia mayor o talasemia intermedia) sino que nos va permitir establecer un pronóstico que nos permita planificar cómo debemos manejar en un futuro las posibles complicaciones de los pacientes. En este mismo sentido, el estudio molecular es necesario para identificar pacientes en la fase pre-sintomática que en el despistaje neonatal presentan una alta sospecha de padecer una forma grave. Aunque no siempre el genotipo se correlaciona con el fenotipo, en la mayoría de las ocasiones la identificación de la lesión molecular nos va a permitir realizar un consejo genético adecuado y desarrollar programas de control, que han demostrado ser eficaces en la reducción de los nacimientos de niños afectados en el caso de la β -talasemia. El estudio molecular es indispensable para realizar el diagnóstico prenatal en las primeras semanas de la gestación y permite, además, la posibilidad de poder realizar un procedimiento de fecundación in vitro para seleccionar embriones sanos que no presenten talasemia y puedan servir como donantes HLA idénticos para un hermano afecto, ampliando las posibilidades de trasplante que puede tener un paciente.

4. AVANCES DE LA HEMATIMETRÍA Y LOS ANALIZADORES

HEMATOLÓGICOS RESPECTO AL ESTUDIO DE LA SERIE ROJA

Durante los últimos 20 años, los analizadores hematológicos han sufrido una enorme evolución tecnológica, aumentándose considerablemente la información que proporcionan (*Briggs et al, 2009*). Además de los resultados tradicionales del hemograma de 9 parámetros y el diferencial leucocitario, hoy en día nos proporcionan nuevos valores, tanto cuantitativos como cualitativos, siendo muchos de ellos de gran ayuda en el diagnóstico clínico.

Los analizadores hematológicos, en general, miden de forma directa el número total de hematíes, VCM, ADE y Hb, siendo el resto de parámetros eritrocitarios calculados (hematocrito, HCM y CHCM).

A partir de 1990, con la incorporación de nuevas tecnologías en los analizadores hematológicos, empiezan a aparecer nuevos parámetros que mejoran el diagnóstico de forma considerable. Los nuevos parámetros de laboratorio más relevantes dentro de la serie roja son los siguientes:

1. Eritroblastos: Su presencia indica una eritropoyesis muy aumentada o daño u ocupación medular y, salvo en los primeros días de vida, siempre es patológica. Los analizadores hematológicos que los cuentan suelen marcar su núcleo después de lisarlos para poder separarlos de los leucocitos. Su presencia nos orienta en el diagnóstico y su recuento automático es mucho más exacto que el manual, dato que en ciertas circunstancias es importante, como en los pacientes con síndromes talasémicos donde, para valorar la eficacia de las

transfusiones, se recomienda tener una cifra de eritroblastos menor de 5 por cada 100 leucocitos (*Fosburg et al, 1990*). Pueden dar lugar a falsas linfocitosis si no son identificados correctamente. Además de eritroblastos, determinados analizadores hematológicos son capaces de identificar la presencia de cuerpos de Howell-Jolly.

2. *Fracción de reticulocitos inmaduros (FRI)*: Son los reticulocitos que contienen mayor cantidad de ARN y, por lo tanto, los más jóvenes. Su aumento predice la recuperación eritropoyética medular hasta 2-3 días antes que el aumento de reticulocitos absolutos, siendo de gran utilidad para valorar la recuperación después de quimioterapia y en anemias carenciales (*Molina et al, 2007*).
3. *Contenido de hemoglobina reticulocitaria media (CHr)*: Sería una medida indirecta del hierro funcional disponible para la producción de hematíes en los últimos 3-4 días. Es de gran utilidad para los estudios de anemia ferropénica y anemia de los trastornos crónicos, así como para valorar el estado férrico de los pacientes en tratamiento con eritropoyetina (*Goodnough et al, 2010*). Algunos analizadores hematológicos han desarrollado parámetros parecidos a CHr basándose en el volumen y en el contenido de Hb de los reticulocitos (cuantos más inmaduros, mayor volumen y menor contenido en Hb), pero no están estandarizados por lo que sus resultados no son comparables entre distintas tecnologías, aunque pueden ser de gran utilidad dentro de cada laboratorio. Entre ellos destacan el *equivalente de hemoglobina reticulocitaria (Ret-He)* y el *contenido de Hb celular media reticulocitaria (CHr)*.

4. Porcentaje de hematíes hipocromos e hipercromos: La posibilidad de medir de forma directa el contenido de Hb de los hematíes (y no sólo de forma calculada) y cuantificar simultáneamente su volumen, ha permitido tener información de 9 poblaciones eritrocitarias. El porcentaje de hematíes hipocromos (%HIPO) es de gran utilidad en el déficit funcional de hierro (*Buttarelli et al, 2010*) y el porcentaje de hematíes hipercrómicos (%HIPER) es de gran valor para sospechar esferocitosis hereditaria (*Conway et al, 2002*). Estas medidas también se pueden realizar sobre la población de reticulocitos.
5. Esquistocitos: Su identificación y cuantificación es fundamental para el diagnóstico de diversas patologías que suponen un riesgo vital para el paciente por lo que los analizadores deben informarnos de su presencia. Su recuento al microscopio es impreciso y subjetivo, habiendo una gran discordancia en sus recuentos. Algunos analizadores informan de su recuento en pantallas de investigación y aunque la sensibilidad es bastante buena (cercana al 100%), la especificidad es menor del 20%. En casos de sospecha, siempre se debe revisar el frotis de sangre periférica (*Lesesve et al, 2004*).

5. PRINCIPALES APORTACIONES DE LA HEMATIMETRÍA AL DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATÍAS

5. 1. Clasificación de las anemias en función de parámetros hematimétricos

A pesar de que para algunos autores la clasificación de las anemias según su VCM elaborada por Wintrobe en 1930 (*Wintrobe et al, 1930*) está ya obsoleta, lo cierto es

que en la práctica clínica no se ha abandonado del todo su uso. Lo más relevante de esta clasificación en lo que a las hemoglobinopatías se refiere, es que las talasemias pertenecen al subgrupo de anemias microcíticas; es decir, con VCM por debajo de lo normal. Al contrario de lo que ocurre con VCM y CHCM, la HCM no se ve afectada por variables preanalíticas (temperatura, tiempo de almacenamiento de la muestra) ni por el número de reticulocitos (*Brugnara et al, 2013*). Esto le convierte en un parámetro más fiable para identificar muestras de pacientes con posible talasemia, que serán aquellas con HCM < 28 pg.

Otra manera de clasificar las anemias está basada en la capacidad eritropoyética de la médula, más concretamente en los reticulocitos, que pueden ser medidos de forma automática por los analizadores hematológicos. De esta forma, distinguimos entre anemias regenerativas (con recuento elevado de reticulocitos) y arregenerativas (recuento normal o disminuido).

5. 2. Diagnóstico diferencial entre ferropenia y talasemia en un paciente con microcitosis.

El déficit de hierro y la talasemia son las dos principales causas de microcitosis, y, dado que su manejo clínico es muy diferente, el hecho de poder discriminar entre ambas entidades tiene implicaciones importantes (*Hallberg et al, 1992*).

Los parámetros de laboratorio más clásicos se han utilizado desde hace años como cribado preliminar de estas entidades, siendo esta estrategia especialmente útil en áreas geográficas donde la prevalencia de talasemia y ferropenia es alta. Aquellos individuos portadores de un rasgo talasémico presentan habitualmente un recuento de hematíes totales mayor, niveles más altos de Hb y CHCM y, por el contrario, menor

VCM y ADE que los pacientes con déficit de hierro (*Urrechaga et al, 2009*). Sin embargo, en ocasiones puede no ser tan sencillo realizar este primer diagnóstico diferencial de anemia microcítica, sobre todo cuando coexisten otras causas carenciales, o en casos de anemia de trastorno crónico (que en ocasiones también puede cursar con microcitosis).

Debido a esto, en los últimos años se han desarrollado nuevos parámetros de laboratorio como las poblaciones eritrocitarias en función del volumen y la concentración de Hb de los hematíes: porcentaje de hematíes macrocíticos (%MACRO), microcíticos (%MICRO), hipercrómicos (%HIPER) e hipocrómicos (%HIPO). De estos cuatro, el que mejor discrimina entre ferropenia y talasemia es %MICRO (es significativamente mayor en portadores de rasgo talasémico). Además del valor numérico de dichos parámetros, los analizadores que emplean la difracción óptica proporcionan eritrogramas con patrones típicos tanto de anemia ferropénica como de talasemia, permitiendo un sencillo diagnóstico de presunción a primera vista (*Urrechaga et al, 2009*).

Algunos autores han desarrollado índices para discriminar de forma rápida ambas patologías, basados en ciertos parámetros de laboratorio de los hematíes que se obtienen de forma automática de los analizadores hematológicos (*England et al, 1973; Mentzer et al, 1973; Urrechaga et al, 2008*). A pesar de tener buena sensibilidad y especificidad, tienen 2 limitaciones: por un lado, fueron desarrollados para discriminar entre anemia ferropénica y beta talasemia heterocigota (por lo que su aplicabilidad en áreas geográficas donde otros tipos de talasemias como la alfa sean muy prevalentes está limitada) y, por otro lado, prácticamente todos ellos hay que calcularlos salvo uno,

el cociente %MICRO/%HIPO (M/H) (calculado de forma automática por los analizadores hematológicos de Siemens).

Además de los mencionados análisis de parámetros aislados o combinaciones de los mismos, se han publicado algunos trabajos en los que se han diseñado funciones matemáticas más complejas basadas en parámetros del hemograma para identificar portadores de rasgo talasémico (*Eldibany et al, 1999; Urrechaga 2013*). La novedad respecto a estudios previos es que han sido capaces de identificar tanto alfa como beta talasemia, discriminando portadores frente a pacientes con anemia ferropénica.

5.3. Hematimetría en la delta-beta talasemia heterocigota

A pesar de ser menos frecuente que la β -talasemia heterocigota, en determinadas áreas geográficas (como España) la $\delta\beta$ -talasemia heterocigota no es una entidad rara y con frecuencia se infradiagnostica ya que ambas entidades se confunden con cierta frecuencia. Por eso, es crucial disponer de herramientas diagnósticas que nos permitan distinguirlas y poder así dar a los portadores un consejo genético adecuado. Los parámetros clásicos del hemograma son muy similares en ambas entidades, con la excepción del ADE que es significativamente mayor en sujetos portadores de $\delta\beta$ -talasemia heterocigota (*Aslan et al, 2002; Donoghue, 1987; Juncá-Piera et al, 1990; Miguel Sosa et al, 1990; Fernández-Valle et al, 1991*).

5. 4. Hematimetría en la alfa talasemia

La principal aportación de los índices corpusculares del hemograma en sujetos con sospecha de α -talasemia es el diagnóstico de presunción del número de genes alfa deletados. En un estudio realizado en España, se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en VCM como en HCM entre aquellos individuos

con uno, dos y tres genes deletados (*Villegas et al, 1998*). Los portadores de α^+ -talasemia heterocigota presentaron VCM medio de 75 fl y HCM media de 26 pg, mientras que en aquellos con pérdida de 2 genes alfa los valores medios fueron 69-70 fl y 22-23 pg. Entre los grupos de α^0 -talasemia heterocigota y α^+ -talasemia homocigota (ambos con pérdida de 2 genes alfa) no se encontraron diferencias significativas. El principal hallazgo de este artículo es que un HCM por debajo de 25 pg obliga a descartar la pérdida de 2 genes alfa, especialmente individuos α^0 , que son los más relevantes de cara al consejo genético.

Estudios posteriores han confirmado estos hallazgos: hay más microcitosis e hipocromía en sujetos con pérdida de 2 genes alfa que en aquellos con pérdida de un solo gen (*Akhavan-Niaki et al, 2012*).

5. 5. Cambios en los índices corpusculares de pacientes con hemoglobinopatías S homocigota

En pacientes con anemia falciforme (HbSS) que reciben tratamiento con Hidroxiurea para prevenir las crisis vasooclusivas se han observado cambios en los parámetros de serie roja del hemograma. Dichos pacientes presentan aumento del VCM y de la HCM respecto a sus valores previos al inicio del tratamiento, y también podemos observar en ellos como se reducen considerablemente tanto la CHCM como el recuento total de reticulocitos así como el %HIPER (*Bridges et al, 1996*).

El %HIPER de estos pacientes puede variar en función de ciertas situaciones clínicas, especialmente antes y/o durante las crisis agudas de dolor (*Ballas et al, 1992; Ballas et al, 1991; Fabry et al, 1984*). Se cree que estas células juegan un papel decisivo en la patogénesis de la enfermedad, debido a su tendencia aumentada a sufrir

polimerización y falciformación. Se ha reportado recientemente que la presencia de hematíes hiperdensos en estos individuos se asocia con una mayor incidencia de úlceras cutáneas, priapismo, disfunción renal y hemólisis (*Bartolucci et al, 2012*).

5. 6. Diferencias entre individuos con hemoglobinopatías SS y SC

Numerosos estudios han demostrado diferencias significativas en la mayoría de parámetros del hemograma entre los pacientes con hemoglobinopatía S homocigota y los individuos con hemoglobinopatía SC.

Los individuos SC presentan un menor grado de anemia y una mayor deshidratación de los hematíes que se traduce en una mayor microcitosis y, sobre todo, en una mayor hipercromía (CHCM) que los pacientes SS (*Ballas et al, 1987; Lawrence et al, 1991*).

6. CARACTERÍSTICAS DEL AUTOANALIZADOR HEMATOLÓGICO

ADVIA 2120 EN EL ANÁLISIS DE LA SERIE ROJA

El analizador Advia 2120 (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY) es un instrumento de diagnóstico hematológico totalmente automatizado, con capacidad para procesar 120 muestras por hora. El sistema Advia 2120 (Figura 7) utiliza la tecnología exclusiva por citometría de flujo bidimensional (2D) mediante la difracción de luz láser. La medida de difracción láser en dos ángulos diferentes hace posible la determinación independiente del VCM y la CHCM, para cada hematíe aisladamente.

Dado que esta tesis doctoral está centrada en el estudio de serie roja, sólo se hará referencia a la tecnología del Advia 2120 para el estudio de hematíes maduros, Hb y reticulocitos.



Figura 7. Analizador Advia 2120

6. 1. ANÁLISIS DE HEMATÍES

6. 1. 1. PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS DE HEMATÍES DEL ANALIZADOR ADVIA 2120

Esferificación isovolumétrica

El reactivo de los hematíes contiene sodio dodecil-sulfato (SDS) y glutaraldehído que producen la esferificación y la fijación parcial de las células rojas y de las plaquetas. La esferificación isovolumétrica elimina el contorno de la célula como factor variable, ya que podría causar resultados erróneos.

Enfoque hidro-dinámico

El reactivo Advia 2120 envolvente/aclarante alinea el flujo de muestra al pasar los dos fluidos por la célula de flujo. Ello produce un único flujo de células de muestra y reduce las coincidencias.

Dispersión de luz monocromática

Los hematíes son analizados en el Advia 2120 utilizando un diodo láser para medir tanto el VCM como la CHCM. La cantidad de luz dispersada en el ángulo bajo (2° - 3°) depende del volumen de la célula y la cantidad de Hb del ángulo alto (5° - 15°) está relacionada con el índice de refracción de la célula. Para los hematíes, el índice de refracción se traduce como la concentración de Hb intracelular y para las plaquetas como la cantidad de granulación (y por tanto el estado de activación).

6. 1. 2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA (CITOGRAMAS E HISTOGRAMAS) DE LOS HEMATÍES EN EL ADVIA 2120

Citograma de Hematíes – MAPA MIE

El citograma Difracción HEM es la representación gráfica de dos mediciones de difracción de luz: la difracción de ángulo alto (5° a 15°) se traza en el eje X y la difracción de la luz de ángulo bajo (2° a 3°) se traza en el eje Y (Figura 8).

El mapa de HEM muestra la relación entre las mediciones de difracción de luz y las características célula a célula de VCM y CHCM. La cuadrícula del mapa abarca volúmenes HEM entre 30 fl y 180 fl, y concentraciones de Hb entre 19 g/dl y 49 g/dl. Las plaquetas se muestran en la esquina inferior izquierda (Figura 8).

Citograma Volumen/Concentración de Hemoglobina (V/CH)

El citograma Volumen/concentración de Hb (V/CH) es una versión lineal del mapa HEM que aparece en el citograma HEM. En el citograma V/CH, la concentración de Hb se representa en el eje X y el volumen celular en el eje Y. En este citograma sólo aparecen hematíes (Figura 9).

El número de células fuera de estos umbrales (volumen 60-120 fl y concentración de hemoglobina 28-41 g/dl) indica un porcentaje de células microcíticas, macrocíticas, hipocrómicas e hiperocrómicas.

Con ello se asegura la detección sensible y específica de poblaciones de hematíes minoritarias, por ejemplo esferocitos, el comienzo de una deficiencia de hierro o de poblaciones dimórficas.

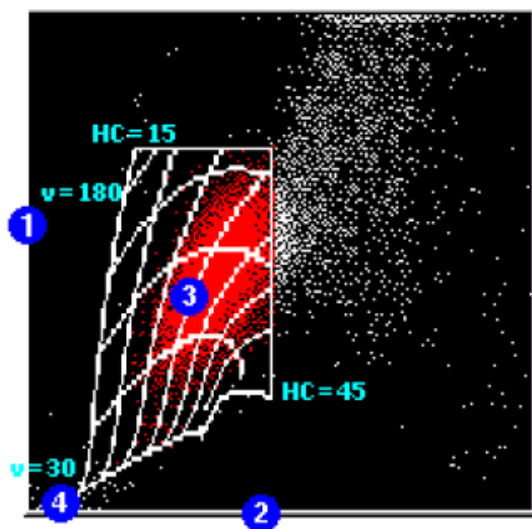


Figura 8. Citograma de Hematíes – MAPA MIE

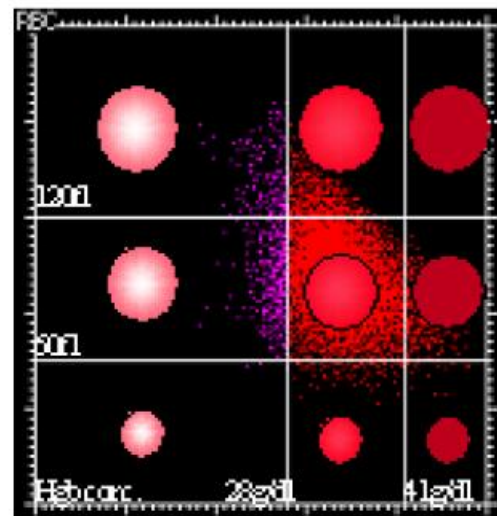


Figura 9. Citograma Volumen /Concentración de Hemoglobina (V/CH)

Histogramas de Hematíes (Figura 10)

-Volumen de hematíes. Campo: 0-200 fl. Umbrales: 60 fl a 120 fl. El VCM es la media del histograma de volumen de hematíes. El ADE o RDW es el coeficiente de variación de la población (anisocitosis).

-Concentración de Hemoglobina. Campo: 0-50 g/dl. Umbrales: 280 g/dl a 41 g/dl. HCM es la media del histograma de concentración de Hb de los hematíes. HDW es la desviación estándar de la población (anisocromía).

-Contenido de Hemoglobina. Campo: 0-100 pg. CH es la media del histograma de contenido de Hb de los hematíes. CHDW es el coeficiente de variación de la población.

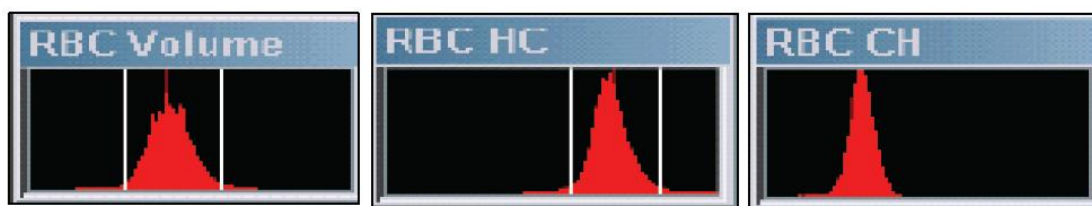


Figura 10. Histogramas de Hematíes

6. 1. 3. VENTAJAS DE LA TECNOLOGÍA ADVIA 2120 EN EL ANÁLISIS DE HEMATÍES

-Fórmula eritrocitaria: La utilización de dos umbrales fijos en cada eje posibilita la definición de nueve áreas celulares en función del volumen celular y el contenido de Hb. Esto proporciona las bases de las alarmas morfológicas de serie roja. El número de células fuera de estos umbrales nos indica el porcentaje de hematíes exacto de microcíticos, macrocíticos, hipocrómicos e hiperocrómicos.

El histograma de hematíes ilustra la detección de las poblaciones minoritarias de hematíes de forma específica y sensible, ayudando a la diferenciación entre las distintas enfermedades y el estadio en que se encuentran, como la deficiencia de hierro, anemia, talasemia y otras patologías de serie roja.

El sistema Advia 2120 proporciona las nueve poblaciones eritrocitarias en valor absoluto y tanto por ciento; además de posicionar gráficamente en el histograma HEM V/HC cada una de las poblaciones eritrocitarias en función de su VCM y CHCM. Estas características son de gran ayuda para el rápido diagnóstico del paciente.

-Ratio Microcitosis/Hipocromía: El sistema Advia 2120 informa del ratio

Microcitosis/Hipocromía, que nos proporciona información valiosa para diagnóstico y la exclusión tanto de la anemia ferropénica como de la talasemia heterocigota.

-Citogramas de ayuda al diagnóstico: Existen distintos patrones gráficos que proporciona el analizador Advia 2120 según las diferentes patologías de serie roja. Este patrón gráfico nos sirve como guía o soporte para el diagnóstico de las distintas patologías eritroides de forma fácil y rápida. Otra de las utilidades de este patrón gráfico es la observación de la evolución de los tratamientos. Un ejemplo gráfico sería el de una anemia ferropénica, donde se puede observar cómo la población macrocítica es desplazada por una población normocítica con la normalización de las constantes.

6. 2. ANÁLISIS DE HEMOGLOBINA

El sistema Advia 2120 utiliza la metodología de referencia por colorimetría y además la metodología láser para el cálculo de la Hb exclusiva de los analizadores Advia 2120. La metodología láser nos proporciona información adicional para llegar a un diagnóstico rápido y fiable.

Evita las interferencias fotométricas con la Hb en casos de lipemia, leucocitosis, crioglobulinas y anemias hemolíticas.

6. 3. ANÁLISIS DE RETICULOCITOS

Los reticulocitos proporcionan una valoración de la actividad eritropoyética en tiempo real. Midiendo tanto el tamaño como el contenido de Hb, el Advia 2120 no sólo

determina el grado de actividad sino también la eficacia de estas células en términos de su capacidad eritropoyética.

6. 3. 1. PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS DE RETICULOCITOS DEL ANALIZADOR ADVIA 2120

Esferificación y tinción

El método de reticulocitos utilizado por el Advia 2120 está basado en el procedimiento de hematíes (véase “esferificación isovolumétrica de los hematíes, punto 6. 1. 1), con la adición de un colorante de ácido nucleico llamado Oxazine 750. Las células son esferificadas de forma isovolumétrica, teñidas y luego analizadas por el láser óptico.

Dispersión de luz monocromática

Las células son posicionadas en función de su volumen en el eje vertical frente a la creciente absorción en el eje horizontal. Cuanto más ARNm haya en la célula, más se va a teñir con Oxazine 750, y tanto más adelante se encontrará en el eje de izquierda a derecha (Figura 11, derecha).

El software del sistema aplica un análisis estadístico a los grupos para delimitar los hematíes maduros de los reticulocitos. La población de reticulocitos puede ser subdividida, entonces, en tres poblaciones de baja, media y alta absorción.

Normalmente, se examinan 40.000 células en diez segundos. Puesto que el analizador realiza un recuento de células, no es necesario hacer un recuento completo de sangre para dar un recuento de reticulocitos absoluto.

6. 3. 2. PARÁMETROS RETICULOCITARIOS PROPORCIONADOS POR EL ADVIA 2120

Además del recuento de reticulocitos (tanto porcentaje como valor absoluto), el Advia 2120 proporciona también el Índice de Maduración de Reticulocitos e Índices Corpusculares de Reticulocitos, como son VCMr, CHr y CHCMr. Además, cuantifica 3

poblaciones reticulocitarias según su fluorescencia en función de su contenido en ARNm [bajo (%L-RTC, L-RTC), medio (%M-RTC, M-RTC) y alto (%H-RTC, H-RTC)].

6. 3. 3. REPRESENTACIÓN GRÁFICA (CITOGRAMAS E HISTOGRAMAS) DE LOS RETICULOCITOS EN EL ADVIA 2120

Citograma Difracción Reticulocitos

Este citograma es la representación gráfica de dos mediciones de difracción. La difracción de ángulo alto se representa a lo largo del eje X, mientras que la difracción de ángulo bajo está representada a lo largo del eje Y.

Las células identificadas como hematíes maduros son teñidas de rojo, mientras que las células identificadas como reticulocitos son teñidos de color azul (Figura 11, izquierda).

Este mapa indica la naturaleza de los reticulocitos como células mayores que los hematíes con una menor concentración de Hb.

Citograma Difracción Abs Reticulocitos

Este citograma es la representación gráfica de las mediciones de absorción y difracción de luz. La absorción de alta ganancia (maduración celular) se representa a lo largo del eje X y la difracción de ángulo alto o poca ganancia (tamaño celular) se representa a lo largo del eje Y (Figura 11, derecha).

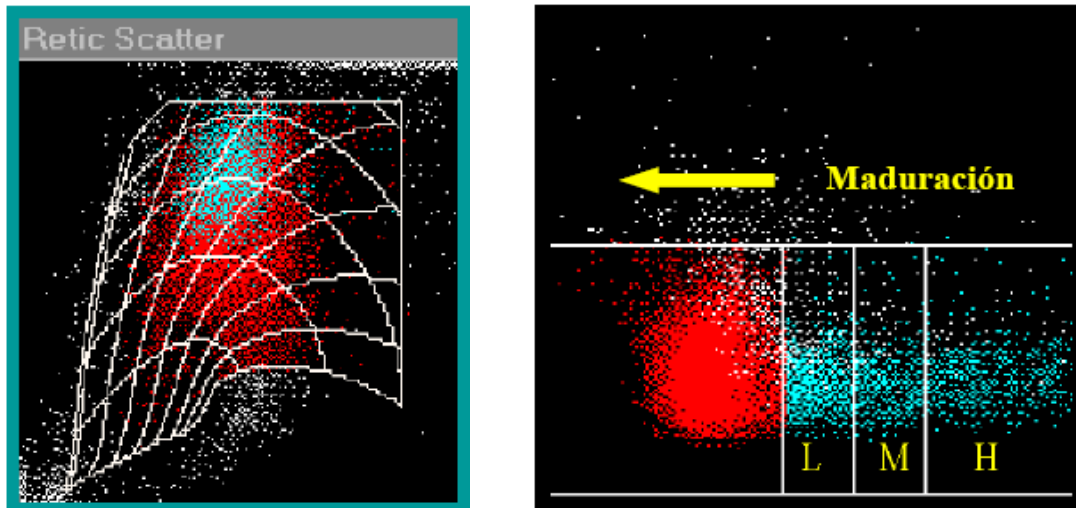


Figura 11.

Histogramas de Reticulocitos (Figura 12)

-Volumen de Reticulocitos. Campo: 0-200 fl. El histograma de volumen de reticulocitos representa la distribución solapada de hematíes maduros y reticulocitos en función del tamaño celular

-Concentración de Hemoglobina de Reticulocitos. Campo: 0-50 g/dl. El histograma de la concentración de Hb de los reticulocitos representa la distribución superpuesta de la concentración de Hb celular de los hematíes maduros y reticulocitos.

-Contenido de Hemoglobina de Reticulocitos. Campo: 0-100 pg. El histograma de Hb celular reticulocitaria representa las distribuciones superpuestas de hematíes maduros y reticulocitos por el peso real o la masa de Hb presente en cada célula.

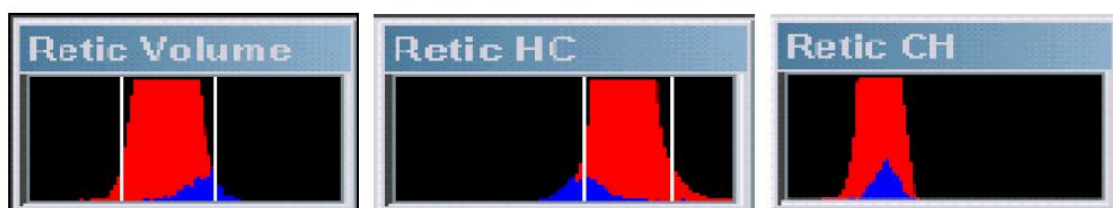


Figura 12. Histogramas de Reticulocitos del Advia 2120

6. 3. 4. VENTAJAS DE LA TECNOLOGÍA ADVIA 2120 EN EL ANÁLISIS DE RETICULOCITOS

-Evaluación en tiempo real de la actividad eritropoyetina. Al medir el tamaño y el contenido de Hb de los reticulocitos, los sistemas Advia evalúan la efectividad de los reticulocitos en relación a la capacidad de síntesis del grupo Hemo a tiempo real evaluando su actividad. Los sistemas Advia proporcionan tres histogramas de gran utilidad clínica en los cuales se representan el volumen (VCMr), concentración de Hb (CHCMr) y contenido de Hb (CHr) de los reticulocitos en azul sobreimpresionados sobre la población de hematíes en rojo.

-CHr o contenido de hemoglobina de los reticulocitos: El parámetro CHr proporciona una instantánea del contenido de hierro de los hematíes al observar el contenido de Hb de los reticulocitos, de gran ayuda en el diagnóstico del déficit de hierro. El diagnóstico de ferropenia se ha basado tradicionalmente en marcadores bioquímicos del metabolismo de hierro, además de los rasgos morfológicos de serie roja (hipocromía, microcitosis). La baja sensibilidad y especificidad de los marcadores bioquímicos ha motivado la búsqueda de marcadores más precisos y eficaces para su diagnóstico. Estudios recientes han demostrado que el CHr es más específico y sensible que la ferritina y la saturación de transferrina para diagnosticar la ferropenia.

-Subpoblaciones reticulocitarias: Podemos hacernos una idea más precisa del estado de la eritropoyesis de un paciente, ya que esta tecnología nos clasifica los reticulocitos en 3 subpoblaciones según su fluorescencia en función de su contenido en ARNm. Así, podemos ser capaces de detectar un mayor componente de eritropoyesis ineficaz que no sea clínicamente significativo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

Demostrar el valor de la hematimetría en el diagnóstico de presunción de hemoglobinopatías.

Objetivos:

- 1) Analizar las diferencias, tanto en los parámetros clásicos del hemograma como en las poblaciones eritrocitarias, entre los portadores de delta-beta talasemia heterocigota, los portadores de beta talasemia heterocigota y pacientes con déficit de hierro.
- 2) Correlacionar las diferencias encontradas con las características fisiopatológicas de cada una de estas tres entidades.
- 3) Comprobar si las diferencias encontradas en los parámetros de hematíes maduros se observan también en los reticulocitos de estos tres grupos de pacientes.
- 4) Intentar encontrar un parámetro o combinación de parámetros del hemograma con la capacidad de predecir si un individuo es portador de una hemoglobinopatía estructural.
- 5) Estudiar las diferencias en los parámetros hematológicos de laboratorio entre sujetos portadores de Hb S heterocigota y sujetos portadores de Hb C heterocigota, y correlacionar dichas diferencias con la fisiopatología de ambas entidades.

ARTÍCULOS

ARTÍCULO Nº 1. $\delta\beta$ -Thalassemia trait: how can we discriminate it from β -thalassemia trait and iron deficiency anemia?

Autores: Diego Velasco-Rodríguez, Juan-Manuel Alonso-Domínguez, Fernando-Ataúlfo González-Fernández, Jesús Villarrubia, Paloma Roperio, Jorge Martínez-Nieto, Félix de la Fuente-Gonzalo, Raquel Guillén, Natalia Acedo, Cristina Serí, Fernando Cava.

Am J Clin Pathol. 2014 Oct; 142 (4): 567-73.

Factor de impacto de la revista (en el momento de su publicación): 2.88

Cuartil de la revista: Q1



$\delta\beta$ -Thalassemia Trait

How Can We Discriminate It From β -Thalassemia Trait and Iron Deficiency Anemia?

Diego Velasco-Rodríguez, MD,¹ Juan-Manuel Alonso-Domínguez, MD,¹ Fernando-Ataúlfo González-Fernández, MD, PhD,^{1,2} Jesús Villarrubia, MD, PhD,¹ Paloma Ropero, PhD,² Jorge Martínez-Nieto, PhD,² Félix de la Fuente, PhD,² Raquel Guillén, PharmD,¹ Natalia Acedo, MD,¹ Cristina Serí, MD,¹ and Fernando Cava, PhD¹

From the ¹Laboratorio Central de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain, and ²Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain.

Key Words: δ ; β ; Thalassemia; Microcytic anemia; Differential diagnosis

Am J Clin Pathol October 2014;142:567-573

DOI: 10.1309/AJCPBQ8UB1WHXTS

ABSTRACT

Objectives: To analyze the differences not only in classic hematologic parameters but also in RBC subpopulations among $\delta\beta$ -thalassemia trait ($\delta\beta$ -TT), β -thalassemia trait (β -TT), and iron deficiency anemia (IDA) and to evaluate the role of fetal hemoglobin (HbF) in elevated RBC distribution width (RDW).

Methods: Samples from 553 patients with microcytosis (74 $\delta\beta$ -TT, 272 β -TT, and 207 IDA) were run on an Advia 2120i analyzer (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY). Classic hematologic parameters and RBC subpopulations were assessed. The correlation between HbF and RDW in patients with thalassemia (both β and $\delta\beta$) was evaluated. An independent sample t test was used to compare classic hematologic parameters and RBC subpopulations among β -TT, IDA, and $\delta\beta$ -TT and receiver operating characteristic curves performed in the significant comparisons.

Results: RDW was significantly higher in $\delta\beta$ -TT compared with β -TT (18.79% vs 16.04%, $P < .001$), as was mean corpuscular volume (66.39 vs 64.82 fL, $P < .001$), mean corpuscular hemoglobin (20.73 vs 20.04 pg, $P < .001$), and mean corpuscular hemoglobin concentration (31.16 vs 30.66 g/dL, $P = .03$). Pearson coefficient showed a good correlation between HbF and RDW. The values obtained for all the parameters were significantly different ($P < .001$) between patients with thalassemia (β and $\delta\beta$) and IDA.

Conclusions: RDW is the best parameter to discriminate $\delta\beta$ -TT from β -TT. The degree of anisocytosis in patients with β -TT and $\delta\beta$ -TT is strongly correlated with HbF.

Upon completion of this activity you will be able to:

- describe the main laboratory parameters required to discriminate among iron deficiency anemia, β -thalassemia trait, and $\delta\beta$ -thalassemia trait.
- predict whether a patient is more likely to have β - or $\delta\beta$ -thalassemia trait based on the mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, and RBC distribution width.

The ASCP is accredited by the Accreditation Council for Continuing Medical Education to provide continuing medical education for physicians. The ASCP designates this journal-based CME activity for a maximum of 1 ACPA Category 1 Credit™ per article. Physicians should claim only the credit commensurate with the extent of their participation in the activity. This activity qualifies as an American Board of Pathology Maintenance of Certification Part II Self-Assessment Module.

The authors of this article and the planning committee members and staff have no relevant financial relationships with commercial interests to disclose. Questions appear on p 576. Exam is located at www.ascp.org/ajcpeme.

Since iron deficiency and thalassemia are the most common causes of microcytic anemia and the clinical management of both pathologies is quite different, the discrimination between thalassemic and nonthalassemic microcytosis has important implications.¹ Iron deficiency anemia (IDA) may result from menstrual loss in childbearing-age women, inadequate iron intake, or chronic blood loss in the gastrointestinal tract in elderly patients.² Impaired globin chain synthesis and decreased hemoglobinization can lead to microcytic anemia in patients with thalassemia.³

Most molecular mechanisms of β -thalassemia are point mutations (single-base substitution) or insertions or deletions involving several nucleotides, while gene deletion is less common. Deletions affecting the β -globin gene cluster result in the syndromes of β -thalassemia, hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH), $\delta\beta$ -thalassemia, and $\gamma\delta\beta$ -thalassemia. The $\delta\beta$ -thalassemia trait ($\delta\beta$ -TT) results from the deletion of

β and δ genes and is characterized by an elevation of fetal hemoglobin (HbF) with normal values of hemoglobin (Hb) A₂.⁴ Patients with a heterozygous condition are asymptomatic or develop mild anemia, whereas homozygotes usually have thalassemia intermedia.⁴

Despite being less frequent than the β -thalassemia trait (β -TT), $\delta\beta$ -TT is not a rare condition in some geographical areas and sometimes may be misdiagnosed, so it is crucial to have efficient tools to distinguish both pathologies to give the patients proper genetic counseling. Classic RBC parameters are similar in both entities, with the exception of RBC distribution width (RDW). HbF is restricted to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults, but the reasons for this fact remain unknown.⁵ Heterogeneous distribution of HbF among RBCs may lead to two different RBC populations and, consequently, to an elevated RDW in patients with $\delta\beta$ -TT.⁶ According to RDW, patients with $\delta\beta$ -TT can be discriminated from those with β -TT.⁷⁻¹⁰ However, no statistical correlation between HbF and RDW has been reported to date. Moreover, since patients with IDA also have elevated RDW, different tools for a presumptive diagnosis can be very helpful if the iron study results are not ready or inconclusive.

It is sometimes inappropriate to use classic hematologic parameters to discriminate patients with IDA from those with thalassemia or anemia of chronic disease.¹¹ Because of that, RBC subpopulations in β -TT and IDA have been evaluated in several studies. Both pathologies have typical patterns in the histograms provided by hematologic analyzers of different manufacturers.¹²⁻¹⁶ In addition, linear discriminant functions based on hemogram data have been proposed to differentiate between IDA and thalassemia, so the samples can be selected for further genetic analysis.¹⁷ However, none of the mentioned studies included patients with $\delta\beta$ -TT, so the question of whether RBC subpopulations are able to discriminate patients with $\delta\beta$ -TT still remains unclear. The aims of our study were (1) to analyze the differences not only in classic hematologic parameters but also in RBC subpopulations among $\delta\beta$ -TT, β -TT, and IDA; (2) to clarify the role of HbF in elevated RDW; and (3) to evaluate the diagnostic performance of the parameters in the three types of microcytosis.

Materials and Methods

Study Samples

Over a 13-month period (March 2012–April 2013), 553 individual unique cases of microcytosis (mean corpuscular volume [MCV] <80 fL) recruited in the Central Laboratory of Madrid, Spain, were initially included in the study: 74 with $\delta\beta$ -TT, 272 with β -TT, and 207 with IDA. All samples were collected in K3-EDTA anticoagulant (Vacuette; Greiner Bio-One, Alphen aan de Rijn, the Netherlands), and a CBC and

an iron panel (serum iron, ferritin, transferrin, and transferrin saturation index [TSI]) were performed in all samples. Patients with IDA with Hb levels less than 90 g/L were not included because in daily practice, they are not considered to have the thalassemia trait. To increase the clinical applicability of the study, patients with thalassemia and concomitant iron deficiency (ferritin <20 ng/mL and/or TSI <20%) were not excluded from the analysis.

Analytical Methods

The CBC was performed with the Advia 2120i analyzer (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY) within 6 hours of collection. Ferritin, transferrin, and TSI were measured by chemiluminescence immunoassay in the Advia Centaur (Siemens Medical Solutions Diagnostics).

HbA₂ and HbF levels were determined by high-performance liquid chromatography on the HA-8160 analyzer (Menarini Diagnostics, Florence, Italy). Patients with increased HbA₂ levels (>3.4%) were considered to have β -TT, whereas diagnosis of $\delta\beta$ -TT was made if HbF was more than 3% and HbA₂ was 3.4% or less. In doubtful cases, a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) study was carried out to screen for deletions in the human β -globin gene cluster. The MLPA is a comparative method based on the quantitative amplification and a subsequent fragment analysis of multiple probes hybridized across a region of interest. Since probe amplification can be achieved only when target DNA is in the sample, this method allows for a genetic profile showing the copy number variation of those targets in a patient's genome. Here we used a commercial kit (MLPA kit P102-B2 HBB; MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) that contains 28 probes designed to detect copy number changes in the hemoglobin β locus, from 1 Mb upstream the locus control region to 10 Kb downstream of β -globin gene. MLPA reactions were performed according to the manufacturer's instructions and as previously described.¹⁸ Amplification products were separated by capillary electrophoresis on an ABI PRISM 3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). GeneMapper version 3.7 (Applied Biosystems) was used for size calling, and the data obtained were analyzed with Coffalyser software (MRC-Holland). Five normal DNA samples, with normal RBC indices, were used as healthy controls for MLPA reactions. Absolute value of HbF was obtained by multiplying total Hb levels by the percentage of HbF.

The following variables obtained from the Advia 2120i analyzer were assessed in the three groups of patients: RBC count, Hb levels, MCV, mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), RDW, percentage of macrocytic RBC (%MACRO), percentage of microcytic RBC (%MICRO), percentage of hyperchromic RBC (%HYPER), and percentage of hypochromic RBC (%HYPO).

To analyze the impact of HbF in the RDW, three subsets of patients with thalassemia were considered: β -TT with HbF less than 2%, β -TT with HbF more than 2%, and $\delta\beta$ -TT.

A second step analysis was made to validate the parameters with higher discriminant efficiency (area under the curve [AUC] >0.8) between $\delta\beta$ -TT and β -TT. Therefore, from June 2013 through March 2014, we prospectively collected all $\delta\beta$ -TT and β -TT cases diagnosed in our laboratory and evaluated whether the best cutoff for those parameters identified the type of thalassemia. For this second step, 218 β -TT and 41 $\delta\beta$ -TT new individual cases were evaluated.

Statistical Analysis

An independent sample *t* test was used to compare classical hematologic parameters and RBC subpopulations among β -TT, IDA, and $\delta\beta$ -TT. Bonferroni correction was used to counteract the problem of multiple comparisons, and *P* values less than .05 were considered statistically significant. Receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted for those parameters that showed significant differences. The AUC of the parameters was used to evaluate their diagnostic performance. A cutoff was selected for RDW to discriminate β -TT from $\delta\beta$ -TT. The Pearson coefficient was estimated to assess the correlation between HbF and RDW and a one-way analysis of variance test was performed to compare the values of RDW in β -TT with HbF less than 2%, β -TT with HbF more than 2%, and $\delta\beta$ -TT. SPSS version 19.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL) was used for statistical analysis of the results.

Results

The reliability of the results is guaranteed with daily internal quality control (provided by the manufacturer) and external quality assessment every month (Hemqual program, Sociedad Española Hematología y Hemoterapia).

Hematologic data of the three groups of patients are summarized in **Table 1**. We found statistically significant differences between β -TT and $\delta\beta$ -TT not only in RDW (18.79% for $\delta\beta$ -TT and 16.04% for β -TT, *P* < .001) but also in MCV (66.39 vs 64.82 fL, *P* < .001), MCH (20.73 vs 20.04 pg, *P* < .001), and MCHC (31.16 vs 30.66 g/dL, *P* = .03). No significant differences in RBCs, Hb, %MACRO, %MICRO, %HYPO, and %HYPER were found between both entities.

Differences in RDW values in β -TT with HbF less than 2% (15.74%), β -TT with HbF more than 2% (17.09%), and $\delta\beta$ -TT (18.79%) were statistically significant (*P* < .001) **Figure 1**. RDW showed high discriminant efficiency (AUC, 0.914), and the cutoff of 17.35% provided a sensitivity of 84.5% and a specificity of 85.9%.

Pearson coefficient showed good correlation between the percentage of HbF and RDW (*r* = 0.762, *P* < .001) **Figure 2** and also between the absolute value of HbF and RDW (*r* = 0.661, *P* < .001) **Figure 3**.

In patients with β -TT, RBC count was higher ($5.95 \times 10^{12}/L$) than in those with IDA ($4.99 \times 10^{12}/L$, *P* < .001), as was Hb (11.90 vs 10.79 g/dL, *P* < .001) and MCHC (30.66 vs 29.34 g/dL, *P* < .001). Mean MCV (64.82 vs 72.31 fL, *P* < .001), MCH (20.04 vs 21.72 pg, *P* < .001), and RDW (16.04% vs 17.59%, *P* < .001) were lower. Significant differences in the four RBC subpopulations were also found: %MACRO (0.02% vs 0.13%, *P* < .001), %MICRO (34.27% vs 18.41%, *P* < .001), %HYPER (0.69% vs 0.26%, *P* < .001), and %HYPO (21.36% vs 34.18%, *P* < .001).

All parameters evaluated showed statistically significant differences between $\delta\beta$ -TT and IDA. RBC count ($5.84 \times 10^{12}/L$ vs $4.99 \times 10^{12}/L$, *P* < .001), Hb levels (12.09 vs 10.79 g/dL, *P* < .001), MCHC (31.16 vs 29.34 g/dL, *P* < .001), and RDW (18.79% vs 17.59%, *P* < .001) were higher in $\delta\beta$ -TT. Mean MCV (66.39 vs 72.31 fL, *P* < .001) and MCH (20.73 vs 21.72 pg, *P* < .001) were higher in IDA. RBC subpopulations analysis revealed higher %MACRO in patients with IDA (0.13% vs 0.03%, *P* < .001), whereas %MICRO was more

Table 1
Hematologic Parameters (Mean \pm SD) in the $\delta\beta$ -Thalassemia Trait, β -Thalassemia Trait, and Iron Deficiency Anemia

Parameter	$\delta\beta$ -TT (n = 74)	$\delta\beta$ -TT vs β -TT, <i>P</i> Value	β -TT (n = 272)	β -TT vs IDA, <i>P</i> Value	IDA (n = 207)	IDA vs $\delta\beta$ -TT, <i>P</i> Value
RBC, $\times 10^{12}/L$	5.84 \pm 0.60	NS	5.95 \pm 0.68	<.001	4.99 \pm 0.59	<.001
Hb, g/dL	12.09 \pm 1.22	NS	11.90 \pm 1.37	<.001	10.79 \pm 1.20	<.001
MCV, fL	66.39 \pm 2.35	<.001	64.82 \pm 3.43	<.001	72.31 \pm 5.25	<.001
MCH, pg	20.73 \pm 1.06	<.001	20.04 \pm 1.35	<.001	21.72 \pm 1.9	<.001
MCHC, g/dL	31.16 \pm 1.10	.03	30.66 \pm 1.06	<.001	29.34 \pm 1.45	<.001
RDW, %	18.79 \pm 1.36	<.001	16.04 \pm 1.34	<.001	17.59 \pm 2.38	<.001
%MACRO	0.03 \pm 0.004	NS	0.02 \pm 0.005	<.001	0.13 \pm 0.016	<.001
%MICRO	32.22 \pm 6.86	NS	34.27 \pm 11.71	<.001	18.41 \pm 11.27	<.001
%HYPER	0.91 \pm 0.67	NS	0.69 \pm 0.51	<.001	0.26 \pm 0.25	<.001
%HYPO	18.16 \pm 8.86	NS	21.36 \pm 9.82	<.001	34.18 \pm 15.25	<.001

Hb, hemoglobin; %HYPER, percentage of hyperchromic RBCs; %HYPO, percentage of hypochromic RBCs; IDA, iron deficiency anemia; %MACRO, percentage of macrocytic RBCs; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; %MICRO, percentage of microcytic RBCs; NS, nonsignificant differences; RDW, RBC distribution width; TT, thalassemia trait.

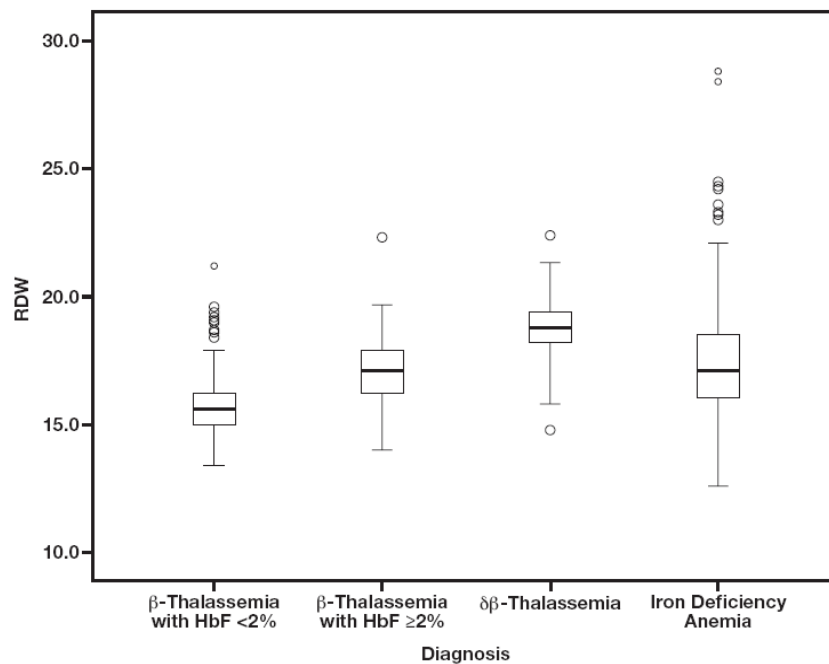


Figure 1 Box-and-whisker plot showing RBC distribution width (RDW) values in the different groups of patients. Differences were statistically significant ($P < .001$).

elevated in those with $\delta\beta$ -TT (32.22% vs 18.41%, $P < .001$). %HYPER was higher in $\delta\beta$ -TT as well (0.91% vs 0.26%, $P < .001$), and %HYPO was lower (18.16% vs 34.18%, $P < .001$). ROC analysis of classic hematologic parameters and RBC subpopulations is summarized in **Table 2**.

In the second step of the study, only RDW (AUC, 0.914) was evaluated to discriminate between $\delta\beta$ -TT and β -TT, since the AUC of MCH and MCV (0.668 and 0.662, respectively) revealed poor diagnostic performance. When a threshold of 17.35% for RDW was applied in the validation group, 185 cases of β -TT (84.9%) and 37 cases of $\delta\beta$ -TT (90.2%) were accurately identified.

Discussion

The treatment of the two most common causes of microcytic anemia is quite different, so it is crucial to distinguish them properly. The study of microcytosis should always include iron parameters. If iron levels are normal or elevated, a thalassemia should be suspected. An elevation of HbA₂, regardless of HbF values, leads to the diagnosis of β -TT. However, if HbA₂ values are normal and determination of HbF is not performed, the patient cannot be properly diagnosed. Both $\delta\beta$ -TT and α -TT show normal values of HbA₂, with elevated and normal HbF values, respectively. Therefore, determination of HbF values plays a key role in

Table 2
Receiver Operating Characteristic Analysis: Area Under the Curve of Hematologic Parameters

Parameter	$\delta\beta$ -TT vs β -TT	β -TT vs IDA	IDA vs $\delta\beta$ -TT
RBC, $\times 10^{12}/L$	NC	0.871	0.856
Hb, g/dL	NC	0.739	0.795
MCV, fL	0.662	0.879	0.837
MCH, pg	0.668	0.763	0.671
MCHC, g/dL	0.630	0.781	0.854
RDW, %	0.914	0.732	0.733
%MACRO	NC	0.724	0.677
%MICRO	NC	0.840	0.849
%HYPER	NC	0.827	0.910
%HYPO	NC	0.754	0.817

Hb, hemoglobin; %HYPER, percentage of hyperchromic RBCs; %HYPO, percentage of hypochromic RBCs; IDA, iron deficiency anemia; %MACRO, percentage of macrocytic RBCs; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; %MICRO, percentage of microcytic RBCs; NC, not calculated; RDW, RBC distribution width; TT, thalassemia trait.

the differential diagnosis of patients with thalassemia and, in our opinion, should always be performed. Otherwise, $\delta\beta$ -TT may be misdiagnosed.

$\delta\beta$ -TT vs β -TT

Patients with thalassemia are characterized by an increase in RBC count as a result of the chronic increase in erythropoiesis with normal or slightly low Hb levels. Decreased hemoglobinization and impaired globin chain synthesis lead to a higher number of divisions in erythroid

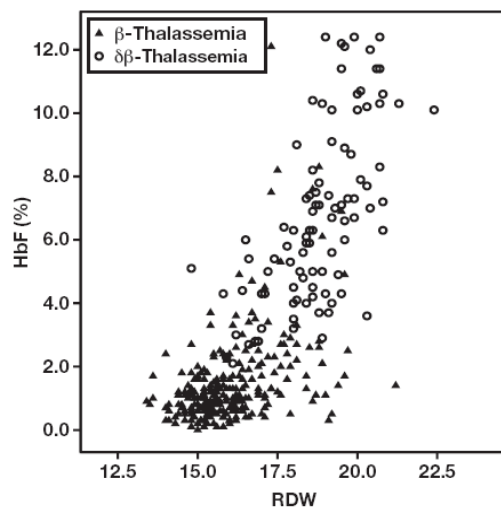


Figure 2 Relationship between the percentage of fetal hemoglobin (HbF) and RBC distribution width (RDW). Correlation coefficient was calculated by Pearson method ($r = 0.762$; $P < .001$).

precursors and therefore to microcytosis in these patients. Several studies have evaluated classic hematologic parameters in β -TT and $\delta\beta$ -TT.^{6-10,12,19} RDW was the only parameter that showed significant differences between both types of thalassemia in all cases, being more elevated in $\delta\beta$ -TT. Vayá et al¹⁹ also reported higher MCV and MCHC in patients with $\delta\beta$ -TT, whereas Fernández Valle et al¹⁰ also found differences in MCV. Our results confirm that patients with $\delta\beta$ -TT have more elevated RDW (18.79% vs 16.04%, $P < .001$) and are also less microcytic and hypochromic. To our knowledge, this is the first study in which the technology of the Advia 2120i was applied to both β -TT and $\delta\beta$ -TT. In previous reports, the CBC of patients with thalassemia was performed with Coulter analyzers⁷⁻⁹ or the H*2 analyzer,¹² or no mention was made of the technology applied.^{6,10}

For unknown reasons, erythroid precursors show a heterogeneous distribution of HbF that can be demonstrated with the Kleihauer-Betke test.²⁰ Analysis of the cellular distribution of HbF by flow cytometry shows heterocellular distribution in $\delta\beta$ -TT, whereas the pattern for HPFH is homocellular.²¹ Neither the Kleihauer-Betke test nor a flow cytometry study was performed in our study. Although differences in RDW between both entities have been reported by many authors,⁶⁻¹⁰ none of the published studies analyzed whether HbF influences RDW. Our results demonstrate that RDW is strongly affected by the percentage and the absolute value of HbF in patients with β -TT and $\delta\beta$ -TT. Therefore, if a patient with laboratory features suggestive of thalassemia shows elevated RDW as well, not only $\delta\beta$ -TT but also β -TT with high levels of HbF should be suspected. In addition,

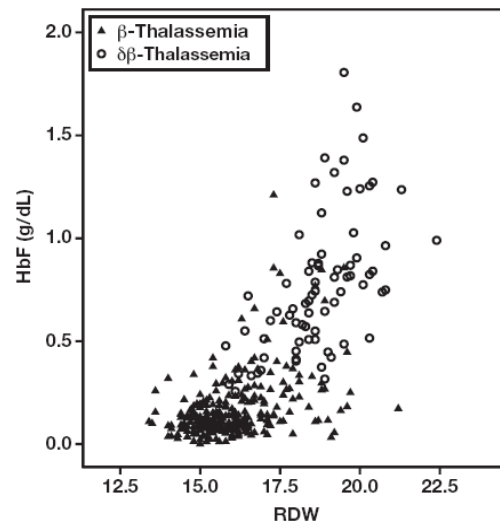


Figure 3 Relationship between the absolute value of fetal hemoglobin (HbF) and RBC distribution width (RDW). Correlation coefficient was calculated by Pearson method ($r = 0.661$; $P < .001$).

although uncommon, $\delta\beta$ -TT carriers may sometimes have normal or slightly elevated RDW. In our study, three (4.05%) of 74 patients with $\delta\beta$ -TT had an RDW of 16.5% or less with lower mean HbF values (2.46%). HbF is increased in patients with $\delta\beta$ -TT due to an overexpression of γ -globin genes by a mechanism of loss of competence of transcription factors that regulate the expression of β -globin genes.²² As a consequence of δ and β gene deletion, those transcription factors interact with the γ -locus promoter zones. Phenotypic expression of HbF depends on the size and location of the deleted sequences. Loss of regulatory regions of the expression of γ -globin genes can also influence HbF synthesis.²³

In patients with $\delta\beta$ -TT, the increase in γ chain synthesis may partially compensate for the lack of β -globin chain synthesis. Therefore, hemoglobinization of $\delta\beta$ -TT erythroid precursors may be increased, which would explain their higher MCHC, and they may consequently undergo fewer divisions and have higher MCV than that in patients with β -TT. MCH is derived from precise measurements of RBC count and Hb. Many authors recommend using MCH instead of MCV to screen for thalassemia, since the stability of MCH during storage of blood samples is higher.^{4,24} MCH was higher in patients with $\delta\beta$ -TT than in those with β -TT, which can be explained by their higher hemoglobinization and higher MCV. Further studies with a larger sample size of prospectively selected $\delta\beta$ -TT and β -TT carriers are needed to confirm these differences in MCH and MCHC. ROC analysis confirmed that RDW is the most efficient single parameter to discriminate between both pathologies (AUC, 0.914), followed by MCH (AUC, 0.668) and MCV (AUC, 0.662).

In the second step of the study, we prospectively identified 218 cases of β -TT and 41 cases of $\delta\beta$ -TT. In total, 84.9% cases of β -TT (185 of 218) and 90.2% cases of $\delta\beta$ -TT (37 of 41) were accurately identified when the cutoff of 17.35% for RDW was applied in the validation group. These results confirm the reliability of RDW to discriminate between both entities. The slightly lower proportion of properly identified β -TT is probably due to persistence of HbF in some of these patients, which leads to higher RDW. Therefore, it would be of great interest if β -TT carriers with and without persistence of HbF could be accurately identified with any hematologic parameter. This question should be addressed in future studies with prospectively selected patients with β -TT. Neither MCH nor MCV was considered in this second analysis, since none proved to be efficient enough.

Even though $\delta\beta$ -TT is less microcytic and less hypochromic than β -TT, no differences in the four RBC subpopulations were found among them. Before Bonferroni correction was applied, %HYPER had proved to be significantly higher and %HYPO lower in $\delta\beta$ -TT compared with β -TT. This circumstance indicates the need for an even larger sample of prospectively selected patients with $\delta\beta$ -TT and β -TT to evaluate the role of RBC subpopulations in their differential diagnosis.

β -TT vs IDA

Patients with β -TT usually have higher RBC counts, higher Hb levels and MCHC, and lower MCV and RDW compared with patients with IDA.¹²⁻¹⁴ In our study, differences between β -TT and IDA were found not only in classic parameters but also in RBC subpopulations with high statistical significance ($P < .001$) in all. These results are similar to those reported previously by Urrechaga et al^{13,14} and Jiménez et al,¹² although Jiménez et al considered β -TT and $\delta\beta$ -TT together as a single group.

Although MCHC was lower in IDA, MCH was higher in patients with IDA compared with those with β -TT. MCH is influenced not only by hemoglobinization but especially by the volume of RBCs.

The volume/hemoglobin concentration erythrogram provided by the Advia 2120i analyzer shows characteristic patterns for both IDA and thalassemia, so a first-sight differential diagnosis can be easily made.¹³ In addition, numeric values for RBC subpopulations are provided. As expected, mean %MICRO was much more increased in β -TT (34.27%) than in IDA (18.41%; $P < .001$), while mean %HYPO showed an opposite trend (21.36% for β -TT and 34.18% for IDA; $P < .001$). To our knowledge, neither %MACRO nor %HYPER has ever been analyzed in patients with β -TT and IDA. A possible explanation for the more elevated %MACRO in patients with IDA could be that bleeding patients were included in this group and, consequently, their reticulocyte counts may have been higher. Iron plays a key role in DNA synthesis, being part

of ribonucleotide reductase, which catalyzes the formation of deoxyribonucleotides.²⁵ Therefore, iron deficiency leads to fewer divisions of erythroid precursors and to a certain degree of macrocytosis compared with β -TT.

In previous studies, RBC count²⁶ and %MICRO^{12,14} have demonstrated to be the most efficient single measurements in the differential diagnosis of IDA and β -TT to date. According to our data, discriminant efficiency of MCV (AUC, 0.879) was higher than RBC count (AUC, 0.871) and %MICRO (AUC, 0.840), which ranked second and third, respectively. %MICRO performed slightly worse than expected, although its AUC was good enough to discriminate both pathologies.

$\delta\beta$ -TT vs IDA

Similar to the comparison between β -TT and IDA, all the parameters (including RBC subpopulations) showed significant differences between $\delta\beta$ -TT and IDA. %HYPER proved to be the most efficient parameter, with an AUC of 0.910, better than RBC count (AUC, 0.856) and MCHC (AUC, 0.854). Most RBCs in IDA are hypochromic, whereas the hemoglobinization of erythroid precursors in $\delta\beta$ -TT is enhanced by the increase in γ chain synthesis. These two factors can explain the differences in %HYPER. Although both entities usually present with elevated RDW, inconsistent differences among them have been reported so far. Similar to results reported by Juncá Piera et al,⁸ higher RDW was found in $\delta\beta$ -TT (18.79% vs 17.59%, $P < .001$) compared with IDA in our study. However, Miguel Sosa et al⁹ did not find those differences. The discrepancy between the published studies may be related to the different criteria of selecting patients and the variety of sample sizes among them.

When a patient with microcytic anemia is evaluated, it is important to bear in mind the possibility of $\delta\beta$ -TT, especially in some geographical areas. This entity can sometimes be mistaken for β -TT and IDA, and since the management of these pathologies is quite different, reliable tools to discriminate them are needed. Genetic counseling for $\delta\beta$ -TT carriers is different from that given to β -TT carriers. Patients with homozygous $\delta\beta$ -thalassemia usually have thalassemia intermedia, which means they can often manage a normal life but may need occasional transfusions depending on the severity of their anemia. On the other hand, symptoms of homozygous β -thalassemia major include severe anemia, splenomegaly, bone deformities, and frequent transfusions that may lead to iron overload. Both classic hematologic parameters and RBC subpopulations have confirmed to be useful in selecting microcytic samples for thalassemia testing, and some (RDW) can discriminate efficiently between $\delta\beta$ -TT and β -TT. To our knowledge, this is the first study that evaluates RBC subpopulations in patients with $\delta\beta$ -TT. However, a possible drawback in our study is the fact that molecular analysis was not performed in all samples.

Sequencing of the β -globin gene was performed only in those samples with inconclusive percentages of HbA₂ and HbF.

In conclusion, although RBC parameters obtained from hematologic analyzers are automated and rapid tools for a presumptive diagnosis in patients with microcytic anemia, they cannot replace the iron panel and determination of both HbA₂ and HbF (when thalassemia is suspected). We demonstrated here the value of RDW as a simple diagnostic tool in the hematology laboratory. When a patient with suspected thalassemia has an elevated RDW, the diagnosis is more likely to be $\delta\beta$ -TT, especially with an RDW of 17.35% or higher in our experience. However, the possibility of β -TT with elevated HbF should also be considered. The RDW is strongly correlated to the percentage of HbF, such that a patient with high HbF levels will have more anisocytosis than a patient with normal levels of HbF. This correlation has not been reported so far. Although RDW was the most reliable parameter to discriminate $\delta\beta$ -TT from β -TT, some others such as MCH, MCV, and MCHC may be also helpful in doubtful cases. Further studies are needed to confirm these results and clarify the efficiency of RBC subpopulations on prospectively selected patients with $\delta\beta$ -TT and β -TT. Finally, both RBC subpopulations and classic hematologic parameters provide good discrimination between thalassemia ($\delta\beta$ -TT and β -TT) and IDA.

Address reprint requests to Dr Velasco-Rodríguez: Dept of Hematology, Central Laboratory of Madrid, Hospital Infanta Sofía, Paseo de Europa 34, 28702 San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain; diegovelascorodriguez@gmail.com.

References

- Hallberg L. Iron requirements. Comments on methods and some crucial concepts in iron nutrition. *Biol Trace Elem Res*. 1992;35:25-45.
- Bothwell TH, Charlton RW. Assessment of the iron nutritional status of a population. *Prog Clin Biol Res*. 1981;77:311-321.
- Thein SL. Pathophysiology of beta thalassemia—a guide to molecular therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005;31-37.
- Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al; British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol*. 2010;149:35-49.
- Boyer SH, Belding TK, Margolet L, et al. Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults. *Science*. 1975;188:361-363.
- Aslan D, Gümrük F, Gürgey A, et al. Importance of RDW value in differential diagnosis of hypochromic anemias. *Am J Hematol*. 2002;69(1):31-33.
- Donoghue AP. Elevated RDW in δ - β thalassemia. *Pathology*. 1987;19:103.
- Juncá Piera J, Farré Guerrero V, Gaspar CR, et al. Hematometric values in δ - β thalassemia minor: special importance of the erythrocyte distribution in comparison with β thalassemia and iron deficiency [in Spanish]. *Sangre (Barc)*. 1990;35:134-136.
- Miguel Sosa A, Linares García M, Miguel García A, et al. Importance of the width of the erythrocyte distribution in the presumptive diagnosis of delta-beta thalassemia minor [in Spanish]. *Sangre (Barc)*. 1990;35:330-331.
- Fernández Valle MC, Risueño CE, Muñoz JA. Distribution of delta-beta thalassemia near the Bahía de Cádiz [in Spanish]. *Sangre (Barc)*. 1991;36:438.
- Bentley SA, Ayscue LH, Watson JM, et al. The clinical utility of discriminant functions for the differential diagnosis of microcytic anemias. *Blood Cells*. 1989;15:575-582.
- Jiménez CV, Minchinela J, Ros J. New indices from the H*2 analyser improve differentiation between heterozygous β or $\delta\beta$ thalassaemia and iron-deficiency anemia. *Clin Lab Haematol*. 1995;17:151-155.
- Urrechaga E. Red blood cell microcytosis and hypochromia in the differential diagnosis of iron deficiency and β -thalassaemia trait. *Int J Lab Hematol*. 2009;31:528-534.
- Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and reticulocyte parameters in iron deficiency and thalassemia. *J Clin Lab Anal*. 2011;25:223-228.
- Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. The role of automated measurement of red cell subpopulations on the Sysmex XE 5000 analyzer in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Int J Lab Hematol*. 2011;33:37-44.
- Urrechaga E. Discriminant value of % microcytic/% hypochromic ratio in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46:1752-1758.
- Urrechaga E, Aguirre U, Izquierdo S. Multivariable discriminant analysis for the differential diagnosis of microcytic anemia. *Anemia*. 2013;2013:457834.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:e57.
- Vayá A, Carratalá A, Martínez C, et al. Haematological and clinical data in 200 cases of thalassaemia trait in eastern Spain. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1983;25:369-373.
- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes by elution. *Klin Wochenschr*. 1957;35:637-638.
- Hoyer JD, Penz CS, Fairbanks VF, et al. Flow cytometric measurement of hemoglobin F in RBCs: diagnostic usefulness in the distinction of hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) and hemoglobin S-hPFH from other conditions with elevated levels of hemoglobin F. *Am J Clin Pathol*. 2002;117:857-863.
- Sankaran VG, Xu J, Byron R, et al. A functional element necessary for fetal hemoglobin silencing. *N Engl J Med*. 2011;365:807-814.
- Katsantoni EZ, Langeveld A, Wai AW, et al. Persistent gamma-globin expression in adult transgenic mice is mediated by HPFH-2, HPFH-3 and HPFH-6 breakpoint sequences. *Blood*. 2003;102:3412-3419.
- Brugnara C, Mohandas N. Red cell indices in classification and treatment of anemias: from M. M. Wintrobe's original 1934 classification to the third millennium. *Curr Opin Hematol*. 2013;20:222-230.
- Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB. Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem Sci*. 1992;17:119-123.
- d'Onofrio G, Zini G, Ricerca BM, et al. Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and beta-thalassemia trait. *Arch Pathol Lab Med*. 1992;116:84-89.

ARTÍCULO Nº 2: Reticulocyte parameters of delta beta thalassaemia trait, beta thalassaemia trait and iron deficiency anaemia.

Autores: Diego Velasco-Rodríguez, Juan-Manuel Alonso-Domínguez, Fernando-Ataúlfo González-Fernández, Jesús Villarrubia, María Sopeña, Lorena Abalo, Paloma Roperio, Jorge Martínez-Nieto, Félix de la Fuente Gonzalo, Fernando Cava.

J Clin Pathol. 2016 Feb; 69 (2): 149-54.

Factor de impacto de la revista (en el momento de su publicación): 2.915

Cuartil de la revista: Q1



Reticulocyte parameters of delta beta thalassaemia trait, beta thalassaemia trait and iron deficiency anaemia

Diego Velasco-Rodríguez,^{1,2,3} Juan-Manuel Alonso-Domínguez,¹ Fernando-Ataúlfo González-Fernández,^{1,4} Jesús Villarrubia,^{1,3} María Sopeña,¹ Lorena Abalo,¹ Paloma Ropero,⁴ Jorge Martínez-Nieto,⁴ Félix de la Fuente Gonzalo,⁴ Fernando Cava¹

¹Department of Haematology, Laboratorio Central de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain

²Programa de Doctorado de Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

³Department of Haematology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

⁴Department of Haematology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

Correspondence to

Diego Velasco-Rodríguez, Department of Haematology, Central Laboratory of Madrid, Hospital Infanta Sofía, Paseo de Europa 34, 28702 San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain; diegovelascorodriguez@gmail.com

Received 21 March 2015

Revised 17 June 2015

Accepted 15 July 2015

Published Online First

11 August 2015

ABSTRACT

Aims To analyse the differences in reticulocyte indices between delta beta thalassaemia trait ($\delta\beta$ -TT), beta thalassaemia trait (β -TT) and iron deficiency anaemia (IDA), and to correlate those differences with the physiopathological features of these three types of microcytoses.

Methods We performed a descriptive study of 428 samples (43 $\delta\beta$ -TT, 179 β -TT and 206 IDA) that were run on Advia 2120 analyser (Siemens). The following reticulocyte indices were assessed: absolute reticulocyte count (ARC), percentage of reticulocytes, mean corpuscular volume of reticulocytes (MCVr), haemoglobin content of reticulocytes (CHR), mean corpuscular haemoglobin concentration of reticulocytes, red blood cell distribution width of reticulocytes (RDWr), haemoglobin distribution width of reticulocytes (HDWr) and reticulocyte subpopulations based on their fluorescence according to mRNA (low (L-R), medium (M-R) and high (H-R)), MCV ratio and MCHC ratio. Correlation between fetal haemoglobin (HbF) and RDWr in patients with thalassaemia was evaluated.

Results RDWr was significantly higher in $\delta\beta$ -TT compared with β -TT (15.03% vs 13.82%, $p<0.001$), and so were HDWr (3.65% vs 3.27%, $p<0.001$), CHR (23.68 vs 22.66 pg, $p<0.001$) and MCVr (88.3 vs 85.5 fL, $p<0.001$). A good correlation was observed between HbF and RDWr ($r=0.551$, $p<0.001$). IDA subjects have more immature reticulocytes, but less ARC than β -TT, suggesting a certain degree of inefficient erythropoiesis in IDA in comparison with β -TT.

Conclusions Previously described differences between $\delta\beta$ -TT, β -TT and IDA in the corpuscular indices of mature red blood cell can also be observed in reticulocytes. The degree of anisocytosis in reticulocytes from patients with thalassaemia is correlated with HbF.

INTRODUCTION

The study of reticulocytes has acquired great interest and increasing importance following the introduction of analysers that use specific dyes for RNA, since precise and accurate counts can be performed even at low concentrations.¹ Reticulocytes are the earliest erythrocytes released into the bloodstream, and they circulate for only 1 or 2 days.² Because of their shorter life span in the circulation compared with mature red blood cells (RBCs; 120 days), the reticulocyte parameters are more reliable tools to evaluate the bone marrow erythroid activity in real

time, given that changes in erythropoiesis can be detected earlier.¹

Some reticulocyte parameters have proved to play a promising role in the study of several RBC disorders. For example, reticulocyte haemoglobin content (CHR) has been used to diagnose and follow-up iron deficiency anaemia (IDA),³ to predict early functional iron deficiency in healthy subjects,⁴ to discriminate between IDA and anaemia of chronic diseases⁵ and to distinguish thalassaemia carriers from healthy^{6–9} and iron-deficient subjects.^{10–19} Quantitative information about immature reticulocytes based on their amount of RNA can also be obtained, and maturation parameters may be helpful in the differential diagnosis of anaemias.¹⁷

Iron deficiency and thalassaemia are the most common causes of microcytic anaemia, and their clinical management is quite different; so, the discrimination between thalassaemic and non-thalassaemic microcytosis has important implications.²⁰

Delta beta thalassaemia trait ($\delta\beta$ -TT) results from the deletion of beta and delta genes, and it is characterised by elevation of fetal haemoglobin (HbF) with normal values of HbA₂.²¹ Patients with heterozygous condition are asymptomatic or develop mild anaemia, whereas homozygotes usually have thalassaemia intermedia. Most molecular mechanisms of beta thalassaemia are point mutations (single-base substitution) or insertions or deletions involving several nucleotides, while gene deletion is less common.²¹ Despite being less frequent than beta thalassaemia trait (β -TT), $\delta\beta$ -TT is not a rare condition in some geographical areas, and may be sometimes misdiagnosed; so, it is crucial to have efficient tools to distinguish both pathologies in order to give the patients a proper genetic counselling.

The role of laboratory parameters of mature cells in $\delta\beta$ -TT has been explored by many authors.^{22–30}

Since reticulocytes are the previous stage in erythropoiesis, it seems reasonable to hypothesise that the differences in corpuscular indices of mature RBC could also be found in reticulocytes, and thus, contribute to explain the differences in the physiopathology of both entities.

Although many studies have explored the utility of reticulocytes in thalassaemic carriers,^{16–19} none of them included patients with $\delta\beta$ -TT. The aims of our study were: (1) to analyse the differences in reticulocyte indices between $\delta\beta$ -TT, β -TT and IDA



CrossMark

To cite: Velasco-Rodríguez D, Alonso-Domínguez J-M, González-Fernández F-A, et al. *J Clin Pathol* 2016;69:149–154.

Original article

and (2) to correlate those differences with the physiopathological features of the three types of microcytosis.

MATERIALS AND METHODS

Study samples

Over a 13-month period (March 2012–April 2013), 552 cases of microcytosis (MCV <80 fL) recruited in Central Laboratory of Madrid were initially included in the study: 74 $\delta\beta$ -TT, 272 β -TT and 206 IDA. Samples were all collected in K3-EDTA anticoagulant (Vacuette; Greiner Bio-One, Alphen aan de Rijn, The Netherlands) and a complete blood count was performed in all of them. Iron panel (serum iron, ferritin, transferrin and transferrin saturation index (TSI)) was performed in all of them. IDA subjects with Hb levels below 90 g/L were not included because they are not confused with thalassaemia trait in daily practice. In order to avoid possible interferences in the analysed parameters in patients with thalassaemia due to concomitant IDA, patients with thalassaemia and concomitant iron deficiency (ferritin <20 ng/mL and/or TSI <20%) were not included in the analysis. No other exclusion criteria were applied.

Haematological analyses

The reticulocyte analyses were all performed in the Advia 2120i analyser (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, New York, USA) in a single run within 6 h of collection. The reticulocyte reagent causes isovolumetric spherizing of RBCs to eliminate the variability of cell shape, and the reticulocytes are stained with a nucleic acid-binding dye called oxazine 750. Low-angle scatter (2° – 3°), high-angle scatter (5° – 15°) and absorbance are measured simultaneously by three detectors as the cells pass through the flow cell. Thus three different cytograms are generated by this technology: (1) high-angle scatter versus absorption, (2) low-angle scatter versus high-angle scatter (Mie cytogram or RBC map) and (3) volume versus Hb concentration. Quantitation and separation of reticulocytes are carried out by the absorption cytogram, and the amount of oxazine staining provides an additional subdivision into low-absorbing, medium-absorbing and high-absorbing cells.

Serum ferritin and transferrin determination

Ferritin, transferrin and TSI were measured by chemiluminescence immunoassay in the Advia Centaur (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, New York, USA).

Molecular analyses

HbA₂ and HbF levels were determined by high-performance liquid chromatography in the HA-8160 analyser (Menarini Diagnostics, Florence, Italy). Patients with increased HbA₂ levels (>3.4%) were considered to have β -TT, whereas diagnosis of $\delta\beta$ -TT was made if HbF >3% and HbA₂ \leq 3.4%. In doubtful cases, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) study was carried out to screen for deletions in the human beta globin gene cluster. The MLPA is a comparative method based on the quantitative amplification and a subsequent fragment analysis of multiple probes hybridised across a region of interest.³¹ Since probe amplification can be achieved only when target DNA is in the sample, this method allows for a genetic profile showing the copy number variation of those targets in a patient's genome. Here, we used a commercial kit (MLPA kit P102-B2 HBB; MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) that contains 28 probes designed to detect copy number changes in the haemoglobin beta locus, from 1 Mb upstream the locus control region to 10 Kb downstream of beta globin gene. MLPA reactions were performed according to the

manufacturer's instructions and as previously described.³¹ Amplification products were separated by capillary electrophoresis on an ABI PRISM 3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). GeneMapper V3.7 (Applied Biosystems) was used for size calling, and the data obtained were analysed with Coffalyser software (MRC-Holland). Five normal DNA samples, with normal RBC indices, were used as healthy controls for MLPA reactions.

Reticulocyte parameters

The following reticulocyte parameters obtained from the Advia 2120i analyser were assessed in the three groups of patients: absolute reticulocyte count (ARC), percentage of reticulocytes (%R), mean corpuscular volume of reticulocytes (MCVr), CHr, mean corpuscular haemoglobin concentration of reticulocytes (MCHCr), red cell distribution width of reticulocytes (RDWr), haemoglobin distribution width of reticulocytes (HDWr) and reticulocyte subpopulations based on their fluorescence according to mRNA (low (L-R), medium (M-R) and high (H-R)). Immature reticulocyte count (IR) was defined as the addition of M-R and H-R. The ratio of MCVr to MCV (MCV ratio) and the ratio of MCHCr to MCHC (MCHC ratio) were calculated to quantify the differences between reticulocytes and mature RBC in size and haemoglobin concentration, respectively.

To analyse the impact of HbF in the RDWr, three subsets of patients were considered: β -TT with HbF <2%, β -TT with HbF >2% and $\delta\beta$ -TT.

Statistical analysis

Mean values and SD were the descriptive statistics used. Shapiro–Wilk test was used to assess the normality of the variables. Independent sample t test was used to compare reticulocyte indices between β -TT, IDA and $\delta\beta$ -TT. Bonferroni correction was used to counteract the problem of multiple comparisons, and p values <0.05 were considered to be statistically significant. Pearson coefficient was estimated to assess the correlation between HbF and RDWr, and one-way analysis of variance test was performed to compare RDWr between β -TT with HbF <2%, β -TT with HbF \geq 2% and $\delta\beta$ -TT. One additional one-way analysis of variance test was performed to compare CHr between the three subsets of patients (β -TT, IDA and $\delta\beta$ -TT). The statistical software package SPSS V19.0 for Windows was used for statistical analysis of the results (SPSS, Chicago, Illinois, USA).

RESULTS

A total number of 43 $\delta\beta$ -TT, 179 β -TT and 206 IDA were finally evaluated. Mean values and SD of reticulocyte parameters of the three groups of patients are summarised in table 1.

No significant differences in ARC and %R were found between $\delta\beta$ -TT and β -TT. The reticulocytes in $\delta\beta$ -TT subjects presented significantly higher MCVr (88.30 vs 85.50 fL, $p<0.001$), higher CHr (23.68 vs 22.66 pg, $p<0.001$), higher RDWr (15.03% vs 13.82%, $p<0.001$) and higher HDWr (3.65% vs 3.27%, $p<0.001$).

Differences in RDWr values in β -TT with HbF <2% (13.52%), β -TT with HbF \geq 2% (14.79%) and $\delta\beta$ -TT (15.03%) were statistically significant ($p<0.001$) (figure 1). Pearson coefficient showed good correlation between the percentage of HbF and RDWr ($r=0.551$, $p<0.001$) (figure 2).

None of the reticulocyte subpopulations based on RNA content showed significant differences between $\delta\beta$ -TT and β -TT.

In β -TT, ARC was higher ($96.49\times 10^9/L$) than in IDA subjects ($87.07\times 10^9/L$, $p<0.001$) as well as %R (1.91% vs 1.71%,

Table 1 Reticulocyte parameters (mean±SD) in $\delta\beta$ -TT, β -TT and IDA

	$\delta\beta$ -TT		β -TT		IDA	
	n=43	$\delta\beta$ -TT vs β -TT	n=179	β -TT vs IDA	n=206	IDA vs $\delta\beta$ -TT
ARC ($\times 10^9/L$)	112.37±40.13	NS	96.49±27.90	p<0.001	87.07±34.06	NS
%R (%)	1.60±0.69	NS	1.91±0.79	NS	1.71±0.55	NS
CHr (pg)	23.68±1.16	p<0.001	22.66±1.34	p<0.001	24.05±2.63	NS
MCVr (fL)	88.30±3.94	p<0.001	85.50±4.67	p<0.001	94.95±6.46	p<0.001
MCHCr (g/dL)	26.93±1.35	NS	26.70±1.12	p<0.001	25.39±1.64	p<0.001
RDWr (%)	15.03±1.50	p<0.001	13.82±1.37	p<0.001	12.80±1.45	p<0.001
HDWr (%)	3.65±0.51	p<0.001	3.27±0.46	NS	3.15±0.54	p<0.001
%L-R (%)	81.67±6.59	NS	81.96±7.42	p<0.001	78.05±6.91	NS
L-R ($\times 10^9/L$)	611.00±153.32	NS	718.25±207.18	p<0.001	552.36±179.37	NS
%M-R (%)	14.92±4.72	NS	14.67±4.96	p<0.001	16.31±3.94	NS
M-R ($\times 10^9/L$)	118.58±62.71	NS	143.66±98.44	NS	206.30±124.09	NS
%H-R (%)	3.38±2.18	NS	3.36±2.92	p<0.001	6.02±6.96	NS
H-R ($\times 10^9/L$)	26.05±21.52	NS	36.63±48.08	NS	41.29±32.80	p<0.001
%IR (%)	18.31±6.60	NS	18.03±7.42	p<0.001	22.33±9.28	NS
IR ($\times 10^9/L$)	144.62±80.43	NS	180.29±142.44	NS	247.59±240.44	NS
MCV ratio	1.32±0.04	NS	1.31±0.04	NS	1.31±0.07	NS
MCHC ratio	0.86±0.04	NS	0.86±0.04	p<0.001	0.84±0.04	NS

%H-R, percentage of high fluorescence reticulocytes; %IR, percentage of immature reticulocytes; %L-R, percentage of low fluorescence reticulocytes; %M-R, percentage of medium fluorescence reticulocytes; %R, percentage of reticulocytes; β -TT, beta thalassaemia trait; $\delta\beta$ -TT, delta beta thalassaemia trait; ARC, absolute reticulocyte count; CHr, haemoglobin content of reticulocytes; HDWr, haemoglobin distribution width of reticulocytes; H-R, absolute value of high fluorescence reticulocytes; IDA, iron deficiency anaemia; IR, absolute value of immature reticulocytes; L-R, absolute value of low fluorescence reticulocytes; MCHCr, mean corpuscular haemoglobin concentration of reticulocytes; MCVr, mean corpuscular volume of reticulocytes; M-R, absolute value of medium fluorescence reticulocytes; NS, non-significant differences; RDWr, red cell distribution width of reticulocytes.

p=0.005), MCHCr (26.70 vs 25.39 g/dL, p<0.001) and RDWr (13.82% vs 12.80%, p<0.001). The size of the reticulocytes (85.50 vs 94.95 fL, p<0.001) and the haemoglobin content (22.66 vs 24.05 pg, p<0.001) were lower in β -TT carriers. Significant differences in some of the reticulocyte subpopulations were also found: %L-R (81.96% vs 78.05%, p<0.001), L-R ($718.25 \times 10^9/L$ vs $552.36 \times 10^9/L$, p<0.001), %M-R (14.67% vs 16.31%, p<0.001), %H-R (3.36% vs 6.02%, p<0.001) and %IR (18.03% vs 22.33%, p<0.001).

MCVr was higher in IDA (94.95 vs 88.30 fL, p<0.001) than in $\delta\beta$ -TT, whereas MCHCr (25.39 vs 26.93 g/dL, p<0.001), RDWr (12.80% vs 15.03%, p<0.001) and HDWr (3.15% vs 3.65%, p<0.001) were higher in $\delta\beta$ -TT. H-R was the only

maturation parameter that showed significant differences between these two entities, being higher in IDA ($41.29 \times 10^9/L$ vs $26.05 \times 10^9/L$, p<0.001).

Differences in CHr values in β -TT (22.66 pg), $\delta\beta$ -TT (23.68 pg) and IDA (24.05 pg) were statistically significant (p<0.001) (figure 3).

MCV ratio was >1, and MCHC ratio was <1 in the three groups, with no significant differences between them.

DISCUSSION

Determination of the number of reticulocytes and some of their cellular properties may provide reliable information about the

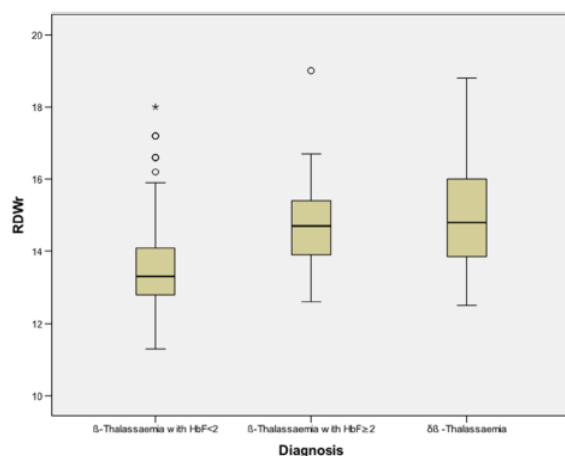


Figure 1 Box-and-whisker plot showing red blood cell distribution width of reticulocytes (RDWr) values in betathalassaemia trait (β -TT) with fetal haemoglobin (HbF) <2%, β -TT with HbF >2% and delta beta thalassaemia trait. Differences were statistically significant (p<0.001).

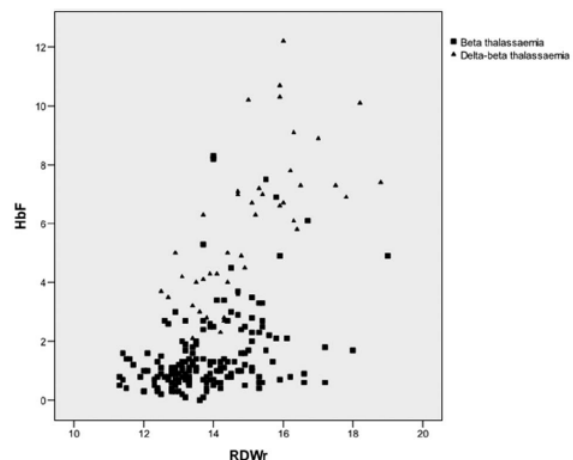


Figure 2 Relationship between the percentage of fetal haemoglobin (HbF) and red blood cell distribution width of reticulocytes (RDWr). Correlation coefficient was calculated by Pearson method (r=0.551, p<0.001).

Original article

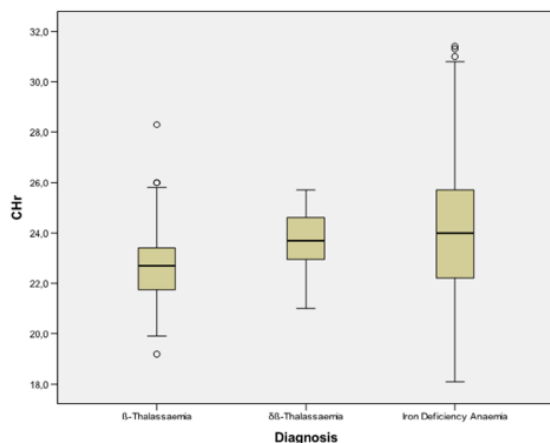


Figure 3 Box-and-whisker plot showing reticulocyte haemoglobin content (CHr) values in delta beta thalassaemia trait, beta-thalassaemia trait and iron deficiency anaemia. Differences were statistically significant ($p < 0.001$).

bone marrow activity.³² Modern automated cell counters produce more accurate results than the manual method and provide information about reticulocyte immaturity, due to the use of fluorescent stains that bind to ribosomal RNA.¹⁷ There is great variability across the different analytical platforms in the additional parameters generated by automated analysers; thus, it is difficult to validate them as diagnostic tools. However, reticulocyte indices provide valuable information for the understanding of the physiopathology of several RBC disorders.

$\delta\beta$ -TT versus β -TT

Laboratory findings in $\delta\beta$ -TT and β -TT are quite similar. However, differences in several parameters of mature RBC between both entities have been reported by many authors so far.^{22–30} RDW was the only parameter that showed significant differences between both types of thalassaemia in all of them, being more elevated in $\delta\beta$ -TT. MCV^{26 29 30} and MCHC^{26 30} of mature RBC are higher in patients with $\delta\beta$ -TT. In a recent study, RDW demonstrated to be strongly affected by the percentage and the absolute value of HbF in patients with β -TT and $\delta\beta$ -TT.³⁰ Moreover, a threshold of 17.35% for RDW identified 90.2% of $\delta\beta$ -TT and 84.9% of β -TT.³⁰ However, none of the mentioned studies included reticulocyte indices.

We decided to evaluate reticulocyte parameters in these two conditions to see if differences in corpuscular indices of mature RBC can also be found in reticulocytes, since reticulocytes are the previous stage in erythropoiesis.

Reticulocytes of $\delta\beta$ -TT have more anisocytosis than β -TT, probably due to the heterogeneous distribution of HbF in erythroid precursors, which can be demonstrated with the Kleihauer-Betke test, although the reasons for this fact remain unknown.³³ Differences in RDW were found even among patients with β -TT with and without elevation of HbF (figure 1). The results of this study demonstrate that RDW is influenced by the percentage of HbF in patients with β -TT and $\delta\beta$ -TT. This finding is in agreement with a recently published report where the same correlation was observed between HbF and RDW of mature RBC.³⁰ However, the correlation in reticulocytes appears to be weaker. The increase of HbF in $\delta\beta$ -TT subjects is due to an over-expression of gamma globin genes by a mechanism of loss of

competence of transcription factors that regulate the expression of beta globin genes.³⁴ As a consequence of delta and beta genes' deletion, those transcription factors interact with the gamma-locus promoter zones. Phenotypic expression of HbF depends on the size and location of the deleted sequences. Loss of regulatory regions of the expression of gamma globin genes can also influence HbF synthesis.³⁵

Microcytosis in patients with thalassaemia can be explained by a higher number of divisions in erythroid precursors due to impaired globin chain synthesis and subsequent decreased haemoglobinisation.³⁰ In $\delta\beta$ -TT subjects, there is an increase in gamma chain synthesis that may partially compensate for the lack of beta globin chain synthesis.³⁰ Therefore, haemoglobinisation of $\delta\beta$ -TT erythroid precursors may be increased compared with β -TT, which would explain their higher CHr (23.68 vs 22.66 pg, $p < 0.001$), and they may consequently undergo fewer divisions and have higher MCVr (88.30 vs 85.50 fL, $p < 0.001$) than β -TT subjects.

CHr is the product of the haemoglobin concentration and the cell volume. When the reticulocytes mature into erythrocytes, the haemoglobin concentration increases as the cell volume decreases; thus, CHr seems to be a more stable parameter than MCHCr.³ Although differences in MCHCr were not significant, probably due to an insufficient $\delta\beta$ -TT sample size, subjects with $\delta\beta$ -TT showed higher MCHCr than β -TT subjects (26.93 vs 26.70 g/dL). Although CHr has proved to distinguish thalassaemia carriers from healthy^{6–9} and iron-deficient subjects,^{1 10–19} it has not, however, been evaluated to date in $\delta\beta$ -TT. Skarmoutsou *et al*⁶ demonstrated that significant differences in CHr were even found between silent β -TT, β^+ -TT and β^0 -TT. CHr was in correlation with the degree of globin chain imbalance, being β^0 -TT the group with the lowest values. Analysis in different types of β -TT was not carried out in our study.

Immature reticulocytes are released from the bone marrow when erythropoietic activity is enhanced.³⁶ In our study, none of the immature reticulocyte subpopulations according to their RNA content showed significant differences between $\delta\beta$ -TT and β -TT.

β -TT versus IDA

Patients with β -TT usually present with higher MCHC and lower MCV and RDW in mature RBC compared with patients with IDA.^{28 37–40} As expected, mean MCVr was more decreased in β -TT (85.50 fL) than in IDA (94.95 fL, $p < 0.001$), and the MCHCr showed an opposite trend (26.70 vs 25.39 g/dL, $p < 0.001$). The unbalanced chain synthesis and the excess of free alpha chains lead to membrane oxidant damage, potassium loss and relative dehydration in β -TT subjects. Iron plays a key role in DNA synthesis, being part of ribonucleotide reductase, which catalyses the formation of deoxyribonucleotides.⁴¹ Therefore, iron deficiency leads to fewer divisions of erythroid precursors and to a certain degree of macrocytosis compared with β -TT. Although MCHCr was lower in IDA, CHr was higher in IDA compared with β -TT subjects (24.05 vs 22.66 pg, $p < 0.001$). Thus, CHr seems to be influenced by haemoglobinisation and especially by the size of RBCs. These results are similar to those reported previously by Vicinanza *et al*,⁷ Chouliaras *et al*,¹³ Urrechaga *et al*¹⁸ and Ceylan *et al*¹⁹ using the same analytical platform. However, some of them reported insufficient sensitivity and/or specificity of CHr for discriminating both entities.^{13 19} CHr values should be interpreted in the context of the overall erythrocyte physiology of the patient due to its diagnostic limitations in patients with recent blood transfusions, iron therapy or concomitant vitamin B₁₂ or folate

deficiency.³ Vicinanza *et al*⁷ proposed ΔCHr as a more precise parameter than CHr , since CHr seems to be less efficient to discriminate patients with pronounced macrocytosis or microcytosis.⁴ ΔCHr can be calculated as the difference between measured CHr and the CHr expected for the corresponding MCVr ($\Delta\text{CHr} = \text{CHr} - \text{CHr-e}$). Sysmex analysers (Sysmex, Kobe, Japan) provide a parameter called reticulocyte haemoglobin equivalent (Ret He, also known as RET-Y), similar but not identical to CHr , that has also been evaluated in $\beta\text{-TT}$ and IDA.^{1 11 12 14 16} Whereas Noronha and Grotto¹¹ and Bartels *et al*¹² found no significant differences between both pathologies, other authors reported differences between $\beta\text{-TT}$ and mild¹⁴ or all types of IDA,¹ and Sudmann *et al*¹⁶ evaluated an efficient and easy-to-calculate algorithm, including Ret He, RBC and ferritin to discriminate between $\beta\text{-TT}$ and IDA.

It may seem surprising that RDWr was higher in $\beta\text{-TT}$ (13.82% vs 12.80%, $p < 0.001$) than in IDA, contrary to what happens in mature RBC, which shows higher degree of anisocytosis in IDA subjects.^{39–42} RDWr is the coefficient of variation of MCVr , defined as the ratio of its SD to its mean. As the mean MCVr (the denominator of the formula) of patients with IDA is higher, their RDWr is lower. Moreover, the cell size of reticulocytes is bigger than mature RBC; so, the RDWr is slightly lower than RDW in both pathologies. In this setting, SD seems to be a more precise measure of dispersion, being more elevated in patients with IDA (1.45 vs 1.37).

IDA subjects had more immature reticulocytes than $\beta\text{-TT}$, suggesting a more enhanced erythropoietic activity, similar to the results reported by Noronha and Grotto¹¹ and Urrechaga *et al*.^{14 18} However, consistent with previous reports,^{11 12 14} the absolute number of reticulocytes was lower in patients with IDA. Therefore, they have more immature reticulocytes, but many of them do not reach the bloodstream, probably suggesting a certain degree of inefficient erythropoiesis in IDA in comparison with $\beta\text{-TT}$. The higher proportion of immature reticulocytes in IDA compared with thalassaemic subjects may be hypothetically a consequence of a higher expression of soluble transferrin receptor (sTfR) mRNA.⁴² In response to insufficient supply of transferrin iron, the synthesis of sTfR is increased proportionally to the cell's iron requirement.⁴³ Therefore, an increase of sTfR plasma levels may reflect an increase in erythroid precursors.⁶ The sTfR has also proved to be correlated with HbA_2 (which reflects the degree of globin chain imbalance) in patients with $\beta\text{-TT}$.⁶ However, De Lima and Grotto³⁶ found no significant differences in sTfR and immature reticulocytes between $\beta\text{-TT}$ and IDA. Unfortunately, we could not evaluate sTfR in this study, since its determination is not available in our laboratory.

$\delta\beta\text{-TT}$ versus IDA

Corpuscular indices were all significantly different between IDA and $\delta\beta\text{-TT}$ with the exception of CHr . Reticulocytes of $\delta\beta\text{-TT}$ subjects were smaller (MCVr 88.30 fL) and denser (MCHCr 26.93 d/dL) than iron deficiency reticulocytes (MCVr 94.95 fL and MCHCr 25.39 g/dL, $p < 0.001$). The heterogeneous distribution of HbF in erythroid precursors explains the higher degree of anisocytosis (RDWr 15.03% vs 12.80%, $p < 0.001$) and anisochromia (HDWr 3.65% vs 3.15%, $p < 0.001$) found in $\delta\beta\text{-TT}$ reticulocytes. The increase of haemoglobinisation of erythroid precursors in $\delta\beta\text{-TT}$ makes them undergo fewer divisions, so differences in MCVr can be explained. None of the maturation parameters showed significant differences between these two entities, with the exception of H-R. Reticulocytes with high mRNA content were much higher in patients with

IDA ($41.29 \times 10^9/\text{L}$ vs $26.05 \times 10^9/\text{L}$, $p < 0.001$), confirming that the expansion of the erythron is more increased in iron-deficient subjects. As it occurred with $\beta\text{-TT}$, the ARC in IDA was lower than in $\delta\beta\text{-TT}$ despite having more immature reticulocytes, suggesting a more ineffective erythropoiesis. Non-significant differences in the rest of maturity parameters could possibly be attributed to the relatively small $\delta\beta\text{-TT}$ sample size.

Maturation ratios

The MCVr was consistently higher than MCV in the three groups we have studied, whereas the behaviour of MCHCr and MCHC showed an opposite trend. Our results are in agreement with d'Onofrio *et al*¹⁰ and Ceylan *et al*,¹⁹ and confirm the classical concept that maturation of the reticulocytes is associated with increase in density and loss of size.

CONCLUSIONS

Previously described differences between $\delta\beta\text{-TT}$ and $\beta\text{-TT}$ in the corpuscular indices of mature RBC can also be observed in reticulocytes. The size of $\delta\beta\text{-TT}$ reticulocytes is slightly bigger and their haemoglobin content is slightly higher in comparison with $\beta\text{-TT}$, and a higher degree of anisocytosis is also observed due to a heterogeneous distribution of HbF in erythroid precursors of $\delta\beta\text{-TT}$. The most immature reticulocytes (with the highest RNA content) are higher in IDA subjects compared with thalassaemic individuals, probably reflecting both an enhanced erythropoiesis that seems to be even more inefficient than thalassaemic erythropoietic activity, and also a higher expression of the mRNA of sTfR. To our knowledge, this is the first study that evaluates reticulocyte parameters in $\delta\beta\text{-TT}$ subjects. A possible drawback in our study is the fact that molecular analysis was not performed in all the samples. Sequencing of the beta globin gene was only performed in those samples with non-conclusive percentages of HbA_2 and HbF.

Clinical applicability of most of these parameters is still to be determined, since the great majority of them are not validated, and no commercial QC material for each of them is available, thus, these results should be interpreted with caution.

In conclusion, although the analysis of corpuscular indices and maturation parameters of reticulocytes cannot replace molecular diagnosis in haemoglobinopathies, it provides qualitative information about their cellular properties, and may contribute to the understanding of the physiopathology of these entities.

Take home messages

- ▶ Delta beta thalassaemia trait ($\delta\beta\text{-TT}$) reticulocytes have slightly higher mean corpuscular volume of reticulocytes and haemoglobin content of reticulocytes than beta thalassaemia trait ($\beta\text{-TT}$) reticulocytes.
- ▶ A higher degree of anisocytosis (red blood cell distribution width of reticulocytes) is also observed in $\delta\beta\text{-TT}$ reticulocytes in comparison with $\beta\text{-TT}$ reticulocytes due to a heterogeneous distribution of fetal haemoglobin in erythroid precursors.
- ▶ Iron deficiency anaemia subjects present a higher percentage of immature reticulocytes, but lower absolute number of reticulocytes compared with thalassaemic individuals, suggesting a more inefficient erythropoietic activity.

Original article

Handling editor Mary Frances McMullin

Contributors DV-R validated the complete blood counts, collected the data and wrote the article. J-MA-D validated the complete blood counts, made the statistical analysis and reviewed the manuscript. F-AG-F validated the HPLC analysis, helped in the interpretation of the results and reviewed the manuscript. JV helped in the interpretation of the results and reviewed the manuscript. MS and LA helped in the collection of the data and reviewed the manuscript. PR, JM-N and FdlFG did the molecular analysis of the doubtful thalassaemic samples. FC reviewed the manuscript.

Competing interests None.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Analysis of reticulocyte parameters on the Sysmex XE 5000 and LH 750 analyzers in the diagnosis of inefficient erythropoiesis. *Int J Lab Hematol* 2011;33:37–44.
- Mast A, Blinder M, Lu Q, et al. Clinical utility of the reticulocyte haemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 2002;99:1489–91.
- Mast AE, Blinder MA, Dietzen DJ. Reticulocyte hemoglobin content. *Am J Hematol* 2008;83:307–10.
- Brugnara C, Zurawski D, Di Canzio J, et al. Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. *JAMA* 1999;281:2225–30.
- Rehu M, Ahonen S, Punnonen K. The diagnostic accuracy of the percentage of hypochromic red blood cells (%HYPom) and cellular hemoglobin in reticulocytes (CHR) in differentiating iron deficiency anemia and anemia of chronic diseases. *Clin Chim Acta* 2011;412:1809–13.
- Skarmoutsou C, Papassotiropoulos I, Traeger-Synodinos J, et al. Erythroid bone marrow activity and red cell hemoglobinization in iron sufficient beta-thalassemia heterozygotes as reflected by soluble transferrin receptor and reticulocyte hemoglobin in content. Correlation with genotypes and Hb A2 levels. *Haematologica* 2003;88:631–6.
- Vicinanza P, Catalano L, Pollio G, et al. Delta-CHR improves the identification of anemic syndromes and the evaluation of hemoglobin synthesis. *Clin Lab Haematol* 2005;27:217–20.
- Krügner F, Zaccariotto TR, Rosim ET, et al. Reticulocyte evaluation in alpha (+)-thalassemia. *Am J Hematol* 2006;81:68–70.
- Wagner SC, Grandt AC, de Castro SM. Reticulocytes indices in β thalassemia trait individuals. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011;33:396–7.
- d'Onofrio G, Chirillo R, Zini G, et al. Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia. *Blood* 1995;85:818–23.
- Noronha JF, Grotto HZ. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in patients with iron deficiency anemia and beta-thalassemia minor. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:195–7.
- Bartels PC, Schoorl M, Schoorl M. Hemoglobinization and functional availability of iron for erythropoiesis in case of thalassemia and iron deficiency anemia. *Clin Lab* 2006;52:107–14.
- Chouliaras G, Stamoulakatou A, Tsiftis G, et al. Age, beta thalassaemia trait, and iron-deficient anaemia significantly affect reticulocyte indices in pre-school children. *Eur J Pediatr* 2010;169:1097–104.
- Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and reticulocyte parameters in iron deficiency and thalassemia. *J Clin Lab Anal* 2011;25:223–8.
- Schoorl M, Schoorl M, Linssen J, et al. Efficacy of advanced discriminating algorithms for screening on iron-deficiency anemia and β -thalassaemia trait: a multicenter evaluation. *Am J Clin Pathol* 2012;138:300–4.
- Sudmann AA, Piehler A, Urdal P. Reticulocyte hemoglobin equivalent to detect thalassaemia and thalassaemic hemoglobin variants. *Int J Lab Hematol* 2012;34:605–13.
- Cortellazzi LC, Teixeira SM, Borba R, et al. Reticulocyte parameters in hemoglobinopathies and iron deficiency anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003;25:97–102.
- Urrechaga E, Hoffmann JJ, Izquierdo S, et al. Differential diagnosis of microcytic anemia: the role of microcytic and hypochromic erythrocytes. *Int J Lab Hematol* 2015;37:334–40.
- Ceylan C, Miskioglu M, Colak H, et al. Evaluation of reticulocyte parameters in iron deficiency, vitamin B(12) deficiency and beta-thalassaemia minor patients. *Int J Lab Hematol* 2007;29:327–34.
- Hallberg L. Iron requirements. Comments on methods and some crucial concepts in iron nutrition. *Biol Trace Elem Res* 1992;35:25–45.
- Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al. British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol* 2010;149:35–49.
- Aslan D, Gümrük F, Gürgey A, et al. Importance of RDW value in differential diagnosis of hypochromic anemias. *Am J Hematol* 2002;69:31–3.
- Donoghue AP. Elevated RDW in δ - β thalassemia. *Pathology* 1987;19:103.
- Juncá Píera J, Farré Guerrero V, Gaspar CR, et al. Hematometric values in δ - β thalassemia minor. Special importance of the erythrocyte distribution in comparison with β thalassemia and iron deficiency. *Sangre (Barc)* 1990;35:134–6. Spanish.
- Miguel Sosa A, Linares García M, Miguel García A, et al. Importance of the width of the erythrocyte distribution in the presumptive diagnosis of delta-beta thalassemia minor. *Sangre (Barc)* 1990;35:330–1. Spanish.
- Fernández Valle MC, Riusoño CE, Muñoz JA. Distribution of delta-beta thalassemia near the Bahía de Cádiz. *Sangre (Barc)* 1991;36:438.
- Bentley SA, Ayscough LH, Watson JM, et al. The clinical utility of discriminant functions for the differential diagnosis of microcytic anemias. *Blood Cells* 1989;15:575–82.
- Jiménez CV, Minchinela J, Ros J. New indices from the H*2 analyser improve differentiation between heterozygous β or $\delta\beta$ thalassaemia and iron-deficiency anemia. *Clin Lab Haem* 1995;17:151–5.
- Vayá A, Carratalá A, Martínez C, et al. Haematological and clinical data in 200 cases of thalassaemia trait in Eastern Spain. *Nouv Rev Fr Hematol* 1983;25:369–73.
- Velasco-Rodríguez D, Alonso-Domínguez JM, González-Fernández FA, et al. Delta-Beta Thalassaemia Trait: how can we discriminate it from Beta Thalassaemia Trait and Iron Deficiency Anemia? *Am J Clin Pathol* 2014;142:567–73.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaij R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
- Brugnara C. Reticulocyte cellular indices: a new approach in the diagnosis of anemias and monitoring of erythropoietic function. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2000;37:93–130.
- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes by elution. *Klin Wochenschr* 1957;35:637–8.
- Sankaran VG, Xu J, Byron R, et al. A functional element necessary for fetal hemoglobin silencing. *N Engl J Med* 2011;365:807–14.
- Katsantoni EZ, Langeveld A, Wai AW, et al. Persistent gamma-globin expression in adult transgenic mice is mediated by HPFH-2, HPFH-3 and HPFH-6 breakpoint sequences. *Blood* 2003;102:3412–19.
- de Lima GA, Grotto HZ. Soluble transferrin receptor and immature reticulocytes are not useful for distinguishing iron-deficiency anemia from heterozygous beta-thalassaemia. *Sao Paulo Med J* 2003;121:90–1.
- d'Onofrio G, Zini G, Ricerca BM, et al. Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and beta-thalassemia trait. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:84–9.
- Urrechaga E. Red blood cell microcytosis and hypochromia in the differential diagnosis of iron deficiency and β -thalassaemia trait. *Int J Lab Hematol* 2009;31:528–34.
- Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. The role of automated measurement of red cell subpopulations on the Sysmex XE 5000 analyzer in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Int J Lab Hematol* 2011;33:30–6.
- Urrechaga E. Discriminant value of % microcytic/% hypochromic ratio in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Clin Chem LabMed* 2008;46:1752–8.
- Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB. Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem Sci* 1992;17:119–23.
- Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052–7.
- Cook JD. The measurement of serum transferrin receptor. *Am J Med Sci* 1999;318:269–76.

ARTÍCULO Nº 3: Laboratory parameters provided by Advia 2120 analyser identify structural haemoglobinopathy carriers and discriminate between Hb S trait and Hb C trait.

Autores: Diego Velasco-Rodríguez, Juan-Manuel Alonso-Domínguez, Fernando-Ataúlfo González-Fernández, Alfonso Muriel, Lorena Abalo, María Sopeña, Jesús Villarrubia, Paloma Roperio, María Paz Plaza, María Tenorio, Ana Jiménez-Martín, Gemma Moreno, Jorge Martínez-Nieto, Félix de la Fuente, Marina Fernández-Escribano, Javier López-Jiménez, Fernando Cava.

J Clin Pathol. 2016 Feb 25. pii: [jclinpath-2015-203556](#). doi: [10.1136/jclinpath-2015-203556](#).

Factor de impacto de la revista (en el momento de su publicación): 2.915

Cuartil de la revista: Q1



Laboratory parameters provided by Advia 2120 analyser identify structural haemoglobinopathy carriers and discriminate between Hb S trait and Hb C trait

Diego Velasco-Rodríguez,^{1,2,3} Juan-Manuel Alonso-Domínguez,² Fernando-Ataúlfo González-Fernández,^{2,4} Alfonso Muriel,¹ Lorena Abalo,² María Sopeña,² Jesús Villarrubia,^{1,2} Paloma Ropero,⁴ María Paz Plaza,¹ María Tenorio,¹ Ana Jiménez-Martín,¹ Gemma Moreno,¹ Jorge Martínez-Nieto,⁴ Félix de la Fuente-Gonzalo,⁴ Marina Fernández-Escribano,¹ Francisco Javier López-Jiménez,¹ Fernando Cava²

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203556>).

¹Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

²Laboratorio Central de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain

³Programa de Doctorado de Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

⁴Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

Correspondence to Diego Velasco-Rodríguez, Department of Hematology, Central Laboratory of Madrid, Hospital Infanta Sofía, Paseo de Europa 34, San Sebastián de los Reyes, Madrid 28702, Spain; diegovelascorodriguez@gmail.com

Received 6 December 2015

Revised 2 February 2016

Accepted 9 February 2016

ABSTRACT

Background Haemoglobinopathies have spread owing to human migration, and the number of people needing diagnosis and management of these conditions is increasing. Clinicians need to accurately identify carriers and provide adequate genetic counselling in order to prevent the occurrence of homozygous or compound heterozygous offspring.

Objectives To identify red blood cell (RBC) laboratory parameters that discriminate between structural haemoglobinopathy carriers and healthy subjects, and to compare RBC laboratory indices between HbAS and HbAC individuals.

Methods Samples of 500 variant Hb carriers (355 HbAS, 104 HbAC, 19 HbAD, 7 HbAE, 7 HbAO-Arab, 4 α -chain variants and 4 Hb Lepore) and 251 normal controls were run on an Advia 2120 analyser (Siemens). Classic haematological parameters and RBC populations were assessed in all subjects. A multivariable binary logistic regression model was created to predict the probability of a subject carrying any structural haemoglobinopathy. HbAS (n=355, 71%) and HbAC (n=104, 20.8%) subjects were compared.

Results A clinical prediction rule was developed by assigning one point to each of the most efficient variables: mean corpuscular volume (MCV) <88.4 fL, RBC distribution width >13.4%, percentage of microcytic RBCs (%MICRO) >0.7% and the ratio of microcytic RBCs to hypochromic RBCs >0.8. A score of 0, 1, 2, 3 or 4, resulted in a probability of 9.6%, 36.3%, 66.7%, 85.2% or 98.3%, respectively. Among the most frequent variant Hb, HbAC subjects had lower values of parameters related to cell size (MCV, %MICRO) and higher values of parameters related to haemoglobin concentration (MCHC, %HYPER) than HbAS subjects. Coexistence of α -thalassaemia in both HbAS and HbAC individuals resulted in decreased Hb, MCV, MCH and MCHC.

Conclusions Structural haemoglobinopathy should be investigated in subjects belonging to ethnic groups with high prevalence of variant Hb and with a score of 3 or 4. Erythrocytes of HbAC subjects are smaller and denser than those of HbAS subjects.

INTRODUCTION

Haemoglobinopathies are the most common genetic disorders worldwide¹ and constitute a significant public health problem.² They are caused by mutations in the globin genes and/or regulatory elements that may produce defective synthesis (thalassaemias) or change the structure of the gene products (structural haemoglobinopathies or variant haemoglobins (Hb)).³

More than 1500 variant Hb have been described.⁴ In more than 95% of variant Hb, the structural alteration is a point mutation that produces a single amino acid substitution in a globin chain.⁵ Depending on the type of amino acid and its position in the globin chain, changes in the structure, stability, solubility and function (oxygen affinity) of the Hb molecule may occur, and these changes are responsible for the clinical manifestations of the resultant haemoglobinopathies.⁶

Most of the variant Hb carriers are asymptomatic, since the molecular alteration results in no significant structural changes.⁷ However, homozygous and compound heterozygous individuals for the most common variant Hb develop significant clinical manifestations. Their prevalence varies greatly from one region to another. In some geographical areas such as northern Europe their prevalence is very low, whereas in other countries they are so common that most of the population carries at least one genetic abnormality that affects the structure or synthesis of Hb.⁸

The high prevalence of the most common variant Hb (HbS, HbC, HbD and HbE) in some regions historically endemic for malaria is primarily determined by the protection of variant Hb carriers against severe *Plasmodium* infection.^{9–10} On the other hand, structural haemoglobinopathies are rare in areas without malaria.¹¹ Thus, geographical distribution of malaria and common variant Hb overlaps. However, their distribution is not homogeneous, and each variant Hb is confined to a certain area. HbS trait (HbAS) occurs throughout sub-Saharan Africa, parts of the Mediterranean (including Greece and southern Turkey) and some parts of the Arabian Peninsula and India; HbC trait

To cite: Velasco-Rodríguez D, Alonso-Domínguez J-M, González-Fernández F-A, et al. *J Clin Pathol*. Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/jclinpath-2015-203556

Original article

(HbAC) occurs in West Africa; HbAE in the southeast of Asia; and HbAD Punjab in India and Pakistan.^{12 13}

Migration flows have significantly increased the prevalence of haemoglobinopathies in first-world countries and they have become an emerging public health problem.^{12 13} The health burden of haemoglobinopathies is expected to increase,^{1 14} so the number of people needing diagnosis and management of these conditions is increasing in both developing and first-world countries. Therefore, efficient screening programmes are becoming necessary.¹⁵ Clinicians need to be able to identify Hb variant carriers accurately and provide adequate genetic counselling in order to prevent, as far as possible, the occurrence of homozygous or compound heterozygous offspring. Furthermore, if patients were identified in a presymptomatic phase, early treatment could be started and long-term severe complications reduced.

Unequivocal diagnosis of haemoglobinopathies can be made only with molecular studies.² However, since DNA analysis is expensive and laborious, it cannot be performed for every sample, and other techniques, such as high-performance liquid chromatography (HPLC), isoelectric focusing and electrophoresis, can identify all the common clinically significant variant Hb with sensitivities and specificities near 100%.² Thus, it would be of great interest if the haematological parameters of people most likely to have a variant Hb were identified by a complete blood count (CBC), since these subjects could be selected for further HPLC analysis. However, no data on the parameters of the CBC as screening tools for the diagnosis of variant Hb have been published. Most published studies of haematological laboratory parameters in Hb variant carriers included only HbAS subjects, while others evaluated only HbAC subjects, and some compared only one of these two variant Hb with normal controls.^{16–25} However, one study did compare HbAS and HbAC, but mean corpuscular volume (MCV) was the only parameter analysed.²⁵

The aims of our study were (1) to identify red blood cell (RBC) laboratory parameters that discriminate between structural haemoglobinopathy carriers and healthy subjects, and (2) to compare RBC laboratory indices between HbAS and HbAC subjects.

MATERIALS AND METHODS

Study samples

Over a 26-month period (October 2012–December 2014), 536 cases of variant Hb recruited in our laboratory were initially included in the study. Of these 371 (69.2%) were incidentally found as abnormal Hb fractions during HbA_{1c} testing in diabetic patients by HPLC.

None of the subjects included had received a blood transfusion in the previous 3 months. Samples were collected in K3-EDTA anticoagulant (Vacuette, Greiner Bio-One, Alphen aan de Rijn, The Netherlands) and a CBC was performed. An iron panel test (serum iron, ferritin, transferrin and Transferrin Saturation Index (TSI)) was performed in all samples. Homozygous and compound heterozygous individuals were not included in the study, since they are easily identified. Each case was counted only once. A total number of 500 subjects with structural haemoglobinopathy were finally evaluated.

Written informed consent forms were signed by 251 volunteers who had not received a blood transfusion within 3 months; their blood samples were used as controls. A CBC was performed in all and the presence of thalassaemia and/or variant Hb was ruled out by HPLC analysis.

This case-controlled study was previously approved by the ethical committee of our institution.

Analytical methods

Hb variants were detected by HPLC in the HA-8160 analyzer (Menarini Diagnostics, Florence, Italy) and further characterised according to their alkaline and acid electrophoretic pattern using cellulose acetate electrophoresis.²⁶ We performed electrophoresis in all the samples as a confirmatory technique, since the HA-8160 analyzer lacks the resolution necessary to accurately identify the different types of variant Hb.

Sequencing of the β - and/or α -globin gene was performed only in those samples with an inconclusive pattern or when genetic counselling was required. In those cases, genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes using an automated method (Bio-Robot EZ1; Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The β -globin gene was amplified using the following two pairs of primers: b1D: 5'-CCT AAG CCA GTG CCA GAA G-3' (from nucleotide (nt) -160 to -142) and CD2: 5'-GAC CTC CCA CAT TCC CTT TT-3' (from nt +1659 to +1643) (all nt positions are given relative to the Cap site=nt 1 from the National Center for Biotechnology Information GenBank). The PCR products were treated with the ABI PRISM BigDye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied BioSystems, Foster City, California, USA) with b1D and CD2 primers for sequencing, according to the manufacturer's instructions, and the sequence was analysed on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied BioSystems).

The CBC was performed in the Advia 2120 analyzer (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, New York, USA) within 6 h of collection. Advia 2120 is a fully automated haematological analyser that provides CBC and leucocyte differential count at a rate of 120 samples/h. A constant volume of the cell suspension from the RBC reaction chamber passes through the flow cell, where the low-angle (2–3°) and high-angle light scatter (5–15°) signatures of each cell are measured. When the Mie theory of light scattering for homogeneous spheres is applied, the low-angle and high-angle light scatter signals for each cell are transformed into volume and Hb concentration values. The relationship between the light-scatter measurements and the cell-by-cell characteristics of volume and Hb concentration is shown by the RBC map. The map grid encompasses RBC volumes between 30 and 180 fL and Hb concentrations between 19 and 49 g/dL. The volume/Hb concentration (V/Hc) cytogram (Mie map) is a linear version of the RBC map that appears on the RBC cytogram. On the V/Hc cytogram, the Hb concentration and the cell volume are plotted along the x and y axes, respectively. Only RBCs appear on this cytogram. Markers organise the cytogram into nine distinct areas of RBC morphology. On the x axis, Hb concentration markers are set at 28 and 41 g/dL. RBCs with Hb concentration <28 g/dL are hypochromic, whereas RBCs with Hb concentration >41 g/dL are hyperchromic. On the y axis, RBC volume markers are set at 60 and 120 fL, so RBCs with a volume <60 fL are microcytic, whereas RBCs with a volume >120 fL are macrocytic. Analysis of the RBC volume and RBC Hb concentration histograms provides a quantitative evaluation of the RBC populations. Additional, qualitative information about RBC populations can be gained from simultaneous analysis of volume and Hb concentration using the RBC V/Hc cytogram—the Mie map.

The following parameters of the CBC directly obtained from the Advia 2120 analyser were assessed in all subjects: absolute RBCs, Hb, MCV, mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean

corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), RBC distribution width (RDW), haemoglobin distribution width (HDW), percentage of macrocytic RBCs (%MACRO), percentage of microcytic RBCs (%MICRO), percentage of hyperchromic RBCs (%HYPER), percentage of hypochromic RBCs (%HYPO) and the ratio of %MICRO to %HYPO (M/H).

Ferritin, transferrin and TSI were measured by chemiluminescence immunoassay in the Advia Centaur (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, New York, USA). Subjects with ferritin values <20 ng/mL and/or TSI <20% were considered to have iron deficiency. Hb A₂ levels, Hb F levels and the percentage of variant Hb were determined by HPLC in the HA-8160 analyser (Menarini Diagnostics, Florence, Italy). According to published studies, subjects with a percentage of variant Hb <35% (for HbS)^{16 27} or <37% (for HbC)^{20 21} were considered to have coexistent α -thalassaemia (α -TT). Subjects with a percentage of HbS <35% or percentage of HbC <37% and also ferritin levels <20 ng/mL and/or TSI <20% were considered to have both coexistent iron deficiency and α -TT.

Statistical analysis

All measurements were expressed as the mean \pm SD. A histogram and the Shapiro–Wilk test were used to assess the normality of our dataset. An independent sample t test was used to compare those parameters with a normal distribution, whereas the Mann–Whitney test was used to compare those indices whose distribution was not normal. Receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted in all the parameters and their area under the curve (AUC) used to evaluate their diagnostic performance. To discriminate between variant Hb carriers and healthy subjects, cut-off points with the greatest value of the sum of sensitivity and specificity were selected for those parameters with an AUC >0.8. These dichotomous variables were directly entered as predictor variables in a multivariable binary logistic regression model, using a backward stepwise procedure, to predict the probability of a subject carrying a structural haemoglobinopathy. Calibration and discrimination were evaluated using the Hosmer–Lemeshow and AUC, respectively, to assess the validity of the model. A simple and easily applied clinical prediction rule was developed by assigning one point to each variable and using a score from 0 to 4. p Values <0.05 were considered to be statistically significant. All analyses were performed using Stata V.14 (Stata Corporation, College Station, Texas, USA).

RESULTS

The reliability of the results was guaranteed by daily internal quality control (provided by the manufacturer) and external quality assessment every month (Hemqual programme, Sociedad Española Hematología y Hemoterapia).

The following types of variant haemoglobin trait were diagnosed: 355 HbAS (71.0%), 104 HbAC (20.8%), 19 HbAD (3.8%), 7 HbAE (1.4%), 7 HbAO-Arab (1.4%), 4 α -chain variants (0.8%) and 4 Hb Lepore (0.8%).

Haematological laboratory parameters of variant Hb carriers and normal controls are summarised in table 1. Significant differences in all parameters were found between variant Hb carriers (any type) and normal controls. Among the variant Hb carriers group, 249 subjects (49.8%) showed also iron deficiency, 150 (30%) had a probable coexisting α -TT and in 96 subjects (19.2%) both alterations were found. Variant Hb carriers in comparison with controls presented significantly higher RBC count ($4.97 \times 10^{12}/L$ vs $4.84 \times 10^{12}/L$, $p=0.003$), lower Hb

Table 1 Haematological laboratory parameters (mean \pm SD) in variant haemoglobin carriers and normal controls

	All cases			Excluding iron deficiency			Excluding α -TT			Excluding iron deficiency and α -TT		
	Variant Hb carriers (n=500)	Normal controls (n=251)	p Value	Variant Hb carriers (n=251)	Normal controls (n=251)	p Value	Variant Hb carriers (n=350)	Normal controls (n=251)	p Value	Variant Hb carriers (n=142)	Normal controls (n=251)	p Value
RBCs ($\times 10^{12}/L$)	4.97 \pm 0.57	4.84 \pm 0.43	0.003	5.02 \pm 0.59	4.84 \pm 0.43	0.003	4.93 \pm 0.56	4.84 \pm 0.43	NS	4.96 \pm 0.55	4.84 \pm 0.43	0.031
Hb (g/dL)	13.63 \pm 1.69	14.59 \pm 1.27	<0.001	14.59 \pm 1.47	14.59 \pm 1.27	<0.001	13.92 \pm 1.59	14.59 \pm 1.27	<0.001	14.33 \pm 1.35	14.59 \pm 1.27	NS
MCV (fL)	82.14 \pm 7.69	92.81 \pm 4.74	<0.001	84.36 \pm 6.80	92.81 \pm 4.74	<0.001	83.83 \pm 6.93	92.81 \pm 4.74	<0.001	85.39 \pm 6.52	92.81 \pm 4.74	<0.001
MCH (pg)	27.57 \pm 2.89	30.18 \pm 1.48	<0.001	28.53 \pm 2.52	30.18 \pm 1.48	<0.001	28.37 \pm 2.41	30.18 \pm 1.48	<0.001	28.97 \pm 2.32	30.18 \pm 1.48	<0.001
MCHC (g/dL)	33.76 \pm 1.89	32.71 \pm 1.17	<0.001	34.07 \pm 1.72	32.71 \pm 1.17	<0.001	34.16 \pm 1.75	32.71 \pm 1.17	<0.001	34.29 \pm 1.78	32.71 \pm 1.17	<0.001
RDW (%)	14.65 \pm 1.87	12.94 \pm 0.62	<0.001	14.16 \pm 1.29	12.94 \pm 0.62	<0.001	14.41 \pm 1.48	12.94 \pm 0.62	<0.001	14.10 \pm 1.24	12.94 \pm 0.62	<0.001
HDW (%)	2.53 \pm 0.49	2.40 \pm 0.21	<0.001	2.45 \pm 0.59	2.40 \pm 0.21	<0.001	2.48 \pm 0.50	2.40 \pm 0.21	NS	2.46 \pm 0.69	2.40 \pm 0.21	NS
%MACRO	0.46 \pm 0.05	1.63 \pm 0.14	<0.001	0.59 \pm 0.09	1.63 \pm 0.14	<0.001	0.57 \pm 0.05	1.63 \pm 0.14	<0.001	0.67 \pm 0.11	1.63 \pm 0.14	<0.001
%MICRO	5.07 \pm 0.40	0.42 \pm 0.03	<0.001	2.93 \pm 0.33	0.42 \pm 0.03	<0.001	3.35 \pm 0.27	0.42 \pm 0.03	<0.001	2.31 \pm 0.20	0.42 \pm 0.03	<0.001
%HYPER	1.38 \pm 0.10	0.45 \pm 0.02	<0.001	1.59 \pm 0.09	0.45 \pm 0.02	<0.001	1.69 \pm 0.09	0.45 \pm 0.02	<0.001	1.99 \pm 0.12	0.45 \pm 0.02	<0.001
%HYPO	3.35 \pm 0.41	2.47 \pm 0.21	<0.001	1.81 \pm 0.60	2.47 \pm 0.21	<0.001	1.63 \pm 0.42	2.47 \pm 0.21	<0.001	1.51 \pm 0.83	2.47 \pm 0.21	<0.001
M/H	8.43 \pm 0.65	0.67 \pm 0.08	<0.001	8.51 \pm 0.76	0.67 \pm 0.08	<0.001	10.05 \pm 0.73	0.67 \pm 0.08	<0.001	9.31 \pm 0.71	0.67 \pm 0.08	<0.001

%HYPER, percentage of hyperchromic RBCs; %HYPO, percentage of hypochromic RBCs; %MACRO, percentage of macrocytic RBCs; %MICRO, percentage of microcytic RBCs; HbA₂, haemoglobin A₂ trait; HDW, haemoglobin distribution width; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; RBC, absolute red blood cell count; RDW, RBC distribution width; α -TT, α -thalassaemia trait.

Original article

(13.63 g/dL vs 14.59 g/dL, $p<0.001$), lower MCV (82.14 fL vs 92.81 fL, $p<0.001$), lower MCH (27.57 pg vs 30.18 pg, $p<0.001$), higher MCHC (33.76 g/dL vs 32.71 g/dL, $p<0.001$), higher RDW (14.65% vs 12.94%, $p<0.001$), higher HDW (2.53% vs 2.40%, $p<0.001$), lower %MACRO (0.46% vs 1.63%, $p<0.001$), higher %MICRO (5.07% vs 0.42%, $p<0.001$), higher %HYPER (1.38% vs 0.45%, $p<0.001$), higher %HYPO (3.35% vs 2.47%, $p<0.001$) and higher M/H (8.43% vs 0.67%, $p<0.001$).

To counteract the influence of iron deficiency and α -TT, these subsets of samples were analysed separately (table 1). When only subjects without α -TT and without iron deficiency were considered, most of the parameters still showed significant differences with the exception of Hb and HDW. Variant Hb carriers presented significantly higher RBC count ($4.96\times 10^{12}/L$ vs $4.84\times 10^{12}/L$, $p=0.031$), lower MCV (85.39 fL vs 92.81 fL, $p<0.001$), lower MCH (28.97 pg vs 30.18 pg, $p<0.001$), higher MCHC (34.29 g/dL vs 32.71 g/dL, $p<0.001$), higher RDW (14.10% vs 12.94%, $p<0.001$), lower %MACRO (0.67% vs 1.63%, $p<0.001$), higher %MICRO (2.31% vs 0.42%, $p<0.001$), higher %HYPER (1.99% vs 0.45%, $p<0.001$), lower %HYPO (1.51% vs 2.47%, $p<0.001$) and higher M/H (9.31% vs 0.67%, $p<0.001$) (table 1).

ROC analysis of haematological parameters in carriers and non-carriers is summarised in table 2. A predictive score was developed including those parameters with the highest discriminant efficiency (AUC>0.8) independently of the iron and α gene status. However, the score was applied to all cases and controls, including iron-deficient and thalassaemic variant Hb carriers, to improve its clinical utility. Four indices were therefore included: MCV, RDW, %MICRO and M/H. MCV showed an AUC of 0.891 and the cut-off point of 88.4 fL provided a sensitivity of 80.4% and a specificity of 85.2%. RDW showed an AUC of 0.852, and the cut-off point of 13.4% provided a sensitivity of 76.4% and a specificity of 80.08%. %MICRO showed an AUC of 0.918 and the cut-off point of 0.7% provided a sensitivity of 86.8% and a specificity of 86.06%. M/H showed an

AUC of 0.877 and the cut-off point of 0.8 provided a sensitivity of 85.6% and a specificity of 78.49%.

A score of 0, 1, 2, 3 or 4, resulted on a probability of a subject carrying a variant Hb of 9.6%, 36.3%, 66.7%, 85.2% or 98.3%, respectively (table 3). A Hosmer–Lemeshow test showed very similar rates of expected and observed events in the different subgroups and the AUC of the score was 0.929.

Comparison of haematological laboratory parameters of HbAS and HbAC subjects is shown in table 4. Iron deficiency was demonstrated in 218/355 HbAS subjects (61.4%) and in 61/104 HbAC (58.7%), whereas 148 HbAS (41.7%) and 26 HbAC (25%) had a probable coexisting α -TT according to our criteria.

The following parameters were significantly higher in HbAC than in HbAS: RBCs ($5.09\times 10^{12}/L$ vs $4.91\times 10^{12}/L$, $p=0.004$), Hb (13.97 g/dL vs 13.47 g/dL, $p=0.017$), MCHC (35.35 g/dL vs 33.29 g/dL, $p<0.001$), RDW (15.16% vs 14.51%, $p=0.002$), HDW (2.68% vs 2.48%, $p=0.001$), %MICRO (7.35% vs 4.58%, $p=0.006$), %HYPER (3.04% vs 0.82%, $p<0.001$) and M/H (22.37 vs 4.59, $p<0.001$). The following parameters were significantly higher in HbAS than in HbAC: MCV (82.92 fL vs 79.15 fL, $p<0.001$), %MACRO (0.45% vs 0.27%, $p=0.033$) and %HYPO (4.51% vs 1.27%, $p<0.001$). When only HbAS and HbAC without iron deficiency and α -TT were evaluated, differences remained significant only in MCV, MCHC, %MICRO, %HYPER and M/H.

ROC analysis of haematological parameters in HbAS and HbAC subjects is summarised in table 5. %HYPER (AUC=0.842), M/H (AUC=0.839) and MCHC (AUC=0.833) were the most efficient parameters to discriminate between HbAS and HbAC. A cut-off point of 1.15% for %HYPER provided a sensitivity of 79.9% and a specificity of 74.4%. A cut-off point of 34.55 g/dL for MCHC provided a sensitivity of 80.6% and a specificity of 72.1%. A cut-off point of 7.3 for M/H provided a sensitivity of 81.6% and a specificity of 76.7%.

Coexistence of α -TT produced a higher degree of anaemia, microcytosis, hypochromia and anisocytosis in both HbAS (table 6) and HbAC (table 7) subjects.

Table 2 Receiver operating characteristic analysis

	All cases	Excluding iron deficiency	Excluding α -TT	Excluding iron deficiency and α -TT
RBCs ($\times 10^{12}/L$)	0.566	0.596	0.541	0.565
Hb (g/dL)	0.677	0.570	0.636	0.553
MCV (fL)	0.891	0.855	0.867	0.834
MCH (pg)	0.800	0.714	0.747	0.669
MCHC (g/dL)	0.701	0.755	0.765	0.783
RDW (%)	0.852	0.814	0.840	0.803
HDW (%)	0.583	0.503	0.547	0.502
%MACRO	0.827	0.777	0.794	0.747
%MICRO	0.918	0.883	0.899	0.853
%HYPER	0.693	0.711	0.749	0.758
%HYPO	0.642	0.737	0.733	0.785
M/H	0.877	0.885	0.892	0.881

Area under the curve of haematological parameters between variant haemoglobin carriers and normal controls. %HYPER, percentage of hyperchromic RBCs; %HYPO, percentage of hypochromic RBCs; %MACRO, percentage of macrocytic RBCs; %MICRO, percentage of microcytic RBCs; Hb, haemoglobin; HDW, haemoglobin distribution width; M/H, ratio of %MICRO to %HYPO; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; RBC, absolute red blood cell count; RDW, RBC distribution width; α -TT, α -thalassaemia trait.

Table 3 A statistical model was developed to predict the probability of an individual of carrying a structural haemoglobinopathy based on four haematological parameters. One point was assigned for each of the following criteria: MCV<88.4 fL, RDW >13.4%, %MICRO >0.7% or M/H >0.7%

Score	Controls	Carriers	Total
0	150 90.4%	16 9.6%	166 100%
1	58 63.7%	33 36.3%	91 100%
2	16 33.3%	32 66.7%	48 100%
3	22 14.6%	127 85.2%	149 100%
4	5 1.7%	292 98.3%	297 100%
Total	251 33.4%	500 66.6%	

%HYPO, percentage of hypochromic RBC; %MICRO, percentage of microcytic RBC; MCV, mean corpuscular volume; M/H, ratio of %MICRO to %HYPO; RBC, absolute red blood cell count; RDW, RBC distribution width.

Table 4 Haematological laboratory parameters and haemoglobin features (mean±SD) in haemoglobin S trait and haemoglobin C trait

	All cases			Excluding iron deficiency			Excluding α-TT			Excluding iron deficiency and α-TT		
	HbAS (n=355)	HbAC (n=104)	p Value	HbAS (n=137)	HbAC (n=43)	p Value	HbAS (n=207)	HbAC (n=78)	p Value	HbAS (n=89)	HbAC (n=36)	p Value
RBCs (×10 ¹² /L)	4.91±0.54	5.09±0.57	0.004	4.56±0.57	5.13±0.60	NS	4.81±0.50	5.09±0.59	<0.001	4.87±0.49	5.07±0.60	NS
Hb (g/dL)	13.47±1.59	13.97±1.91	0.017	14.12±1.34	14.64±1.66	0.04	13.78±1.41	14.36±1.80	0.013	14.25±1.22	14.73±1.72	NS
MCV (fL)	82.92±7.57	79.15±6.90	<0.001	85.48±6.30	81.71±6.35	0.001	85.74±5.75	80.61±6.32	<0.001	87.39±5.09	82.62±6.16	<0.001
MCH (pg)	27.56±2.89	27.47±2.78	NS	28.60±2.33	28.63±2.41	NS	28.72±1.98	28.22±2.42	NS	29.30±1.74	29.07±2.17	NS
MCHC (g/dL)	33.29±1.70	35.35±1.55	<0.001	33.61±1.40	35.55±1.43	<0.001	33.72±1.43	35.66±1.46	<0.001	33.79±1.38	35.68±1.50	<0.001
RDW (%)	14.51±1.88	15.16±1.88	0.002	14.04±1.30	14.40±1.18	NS	14.16±1.36	14.87±1.64	<0.001	13.87±1.18	14.33±1.24	NS
HDW (%)	2.48±0.52	2.68±0.38	0.001	2.40±0.67	2.52±0.24	NS	2.41±0.58	2.59±0.25	0.014	2.40±0.83	2.53±0.25	NS
%MACRO	0.45±0.04	0.27±0.06	0.033	0.65±0.09	0.38±0.14	NS	0.59±0.06	0.32±0.09	0.03	0.78±0.12	0.45±0.16	NS
%MICRO	4.58±0.47	7.35±0.92	0.006	2.39±0.33	4.44±0.78	0.02	2.18±0.25	5.06±0.60	<0.001	1.32±0.19	3.81±0.16	0.003
%HYPER	0.82±0.05	3.04±0.32	<0.001	0.85±0.09	3.29±0.65	0.001	1.00±0.08	3.35±0.40	<0.001	1.03±0.13	3.65±0.75	0.002
%HYPO	4.51±0.54	1.27±0.34	<0.001	2.15±0.60	0.34±0.07	0.004	1.72±0.42	0.49±0.16	0.008	1.67±0.85	0.33±0.07	NS
MH	4.59±0.37	22.37±2.23	<0.001	4.88±0.68	20.70±2.81	<0.001	4.87±0.49	25.11±2.78	<0.001	4.83±0.77	19.69±3.21	<0.001
Hb A ₂ (%)	4.18±0.72	3.09±0.45	<0.001	4.20±0.74	3.12±0.46	<0.001	4.02±0.60	3.10±0.47	<0.001	4.00±0.61	3.12±0.50	<0.001
Hb F (%)	0.51±0.03	0.44±0.08	NS	0.45±0.03	0.48±0.08	NS	0.43±0.03	0.49±0.10	NS	0.38±0.03	0.51±0.10	NS
%Variant Hb	35.33±3.60	38.90±2.78	<0.001	36.07±3.27	39.30±2.64	<0.001	37.66±1.60	40.21±1.51	<0.001	37.91±1.71	40.24±1.46	<0.001

%HYPER, percentage of hyperchromic RBCs; %HYPO, percentage of hypochromic RBCs; %MACRO, percentage of macrocytic RBCs; %MICRO, percentage of microcytic RBCs; Hb, haemoglobin; HbAC, haemoglobin C trait; HbAS, haemoglobin S trait; HDW, haemoglobin distribution width; MH, ratio of %MICRO to %HYPO; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; RDW, RBC distribution width; α-TT, α-thalassaemia trait.

%HYPER, percentage of hypochromic RBCs; %HYPO, percentage of hypochromic RBCs; %MACRO, percentage of macrocytic RBCs; %MICRO, percentage of microcytic RBCs; Hb, haemoglobin; HbAC, haemoglobin C trait; HbAS, haemoglobin S trait; HDW, haemoglobin distribution width; MH, ratio of %MICRO to %HYPO; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; RBC, absolute red blood cell count; RDW, RBC distribution width; α-TT, α-thalassaemia trait.

Original article

Table 5 Receiver operating characteristic analysis

	All cases	Excluding iron deficiency	Excluding α -TT	Excluding iron deficiency and α -TT
RBCs ($\times 10^{12}/L$)	0.597	NC	0.651	NC
Hb (g/dL)	0.568	0.586	0.582	NC
MCV (fL)	0.660	0.671	0.728	0.730
MCH (pg)	NC	NC	NC	NC
MCHC (g/dL)	0.833	0.840	0.847	0.829
RDW (%)	0.625	NC	0.638	NC
HDW (%)	0.695	NC	0.731	NC
%MACRO	0.630	NC	0.675	NC
%MICRO	0.686	0.698	0.749	0.764
%HYPER	0.842	0.813	0.828	0.794
%HYPO	0.706	0.732	0.729	NC
M/H	0.839	0.829	0.852	0.802
Hb A ₂ (%)	0.916	0.919	0.900	0.881
Hb F (%)	NC	NC	NC	NC
%Variant Hb	0.795	0.805	0.869	0.849

Area under the curve of haematological parameters between HbAS and HbAC.
 %HYPER, percentage of hyperchromic RBCs; %HYPO, percentage of hypochromic RBCs; %MACRO, percentage of macrocytic RBCs; %MICRO, percentage of microcytic RBCs; Hb, haemoglobin; HbAC, haemoglobin C trait; HbAS, haemoglobin S trait; HDW, haemoglobin distribution width; M/H, ratio of %MICRO to %HYPO; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; RBC, absolute red blood cell count; RDW, RBC distribution width; α -TT, α -thalassaemia trait.

DISCUSSION

Variant Hb carriers versus normal controls

When both groups were firstly compared, we found that erythrocytes from Hb variant carriers were significantly smaller, denser and had less haemoglobin content than erythrocytes from healthy subjects (table 1). Although laboratory findings in variant Hb carriers and normal controls were quite different, the high prevalence of coexisting iron deficiency and/or α -TT in the variant Hb group seemed to have a great effect on those differences. To evaluate the precise influence of the Hb phenotype

Table 6 Haematological laboratory parameters (mean \pm SD) in HbAS subjects, with and without α -thalassaemia

Laboratory parameters	HbAS (n=207)	HbAS with coexistent α -TT (n=139)	p Value
RBCs ($\times 10^{12}/L$)	4.81 \pm 0.50	5.05 \pm 0.57	<0.001
Hb (g/dL)	13.78 \pm 1.41	13.07 \pm 1.76	<0.001
MCV (fL)	85.74 \pm 5.75	79.21 \pm 8.01	<0.001
MCH (pg)	28.72 \pm 1.98	25.99 \pm 3.16	<0.001
MCHC (g/dL)	33.72 \pm 1.43	32.65 \pm 1.87	<0.001
RDW (%)	14.16 \pm 1.36	15.01 \pm 2.40	<0.001
HDW (%)	2.41 \pm 0.58	2.57 \pm 0.42	0.009
%MACRO (%)	0.59 \pm 0.06	0.29 \pm 0.05	0.001
%MICRO (%)	2.18 \pm 0.25	7.30 \pm 0.98	<0.001
%HYPER (%)	1.00 \pm 0.08	0.56 \pm 0.05	<0.001
%HYPO (%)	1.72 \pm 0.42	7.16 \pm 1.14	<0.001
M/H	4.87 \pm 0.49	3.84 \pm 0.48	NS

%HYPER, percentage of hyperchromic RBCs; %HYPO, percentage of hypochromic RBCs; %MACRO, percentage of macrocytic RBCs; %MICRO, percentage of microcytic RBCs; Hb, haemoglobin; HbAC, haemoglobin C trait; HbAS, haemoglobin S trait; HDW, haemoglobin distribution width; M/H, ratio of %MICRO to %HYPO; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; RBC, absolute red blood cell count; RDW, RBC distribution width; α -TT, α -thalassaemia trait.

Table 7 Haematological laboratory parameters (mean \pm SD) in HbAC subjects, with and without α -thalassaemia

Laboratory parameters	HbAC n=78	HbAC with coexistent α -TT n=26	p Value
RBCs ($\times 10^{12}/L$)	5.09 \pm 0.59	5.08 \pm 0.53	NS
Hb (g/dL)	14.36 \pm 1.80	12.81 \pm 1.76	<0.001
MCV (fL)	80.61 \pm 6.32	74.79 \pm 6.82	<0.001
MCH (pg)	28.22 \pm 2.42	25.22 \pm 2.62	<0.001
MCHC (g/dL)	35.66 \pm 1.46	34.40 \pm 1.45	<0.001
RDW (%)	14.87 \pm 1.64	16.02 \pm 2.29	0.025
HDW (%)	2.59 \pm 0.25	2.97 \pm 0.54	0.003
%MACRO (%)	0.32 \pm 0.09	0.13 \pm 0.04	0.008
%MICRO (%)	5.06 \pm 0.60	14.03 \pm 1.03	<0.001
%HYPER (%)	3.35 \pm 0.40	1.42 \pm 0.34	0.043
%HYPO (%)	0.49 \pm 0.16	1.13 \pm 0.23	<0.001
M/H	25.11 \pm 2.78	7.87 \pm 2.51	0.039

%HYPER, percentage of hyperchromic RBCs; %HYPO, percentage of hypochromic RBCs; %MACRO, percentage of macrocytic RBCs; %MICRO, percentage of microcytic RBCs; Hb, haemoglobin; HbAC, haemoglobin C trait; HbAS, haemoglobin S trait; HDW, haemoglobin distribution width; M/H, ratio of %MICRO to %HYPO; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; RBC, absolute red blood cell count; RDW, RBC distribution width; α -TT, α -thalassaemia trait.

in corpuscular indices of RBCs, the analysis was also performed excluding variant Hb samples with coexisting iron deficiency and/or α -TT. Only two parameters lost their statistical significance (Hb and HDW), which highlights the influence of the type of variant β -globin chains in the mentioned differences.

The activity of K⁺Cl⁻ cotransporter of the erythrocytes of structural haemoglobinopathy carriers (mainly HbAS and HbAC) is known to be increased owing to interactions of the variant Hb with the membrane, leading to increased K⁺ and Cl⁻ efflux that is not compensated by Na⁺ influx or Na⁺/H⁺ exchange.²⁸ This phenomenon occurs similarly in homozygous and compound heterozygous subjects,²⁹ although to a lesser extent in heterozygous individuals.²⁸ Therefore, the erythrocytes become dehydrated, and this increase in their density is reflected in a higher MCHC than in normal controls. The loss of water also results in decreased cell size that is reflected in a lower MCV.

Our results are in agreement with previously published studies. Hinchliffe *et al*²³ reported raised MCHC in HbAS, HbAC and HbAD in comparison with normal controls, with the highest values found in HbAC subjects, followed by HbAD and HbAS subjects, respectively.²³ Several authors have reported lower MCV in variant Hb than in normal individuals.^{17 23–25} The microcytosis found in different Hb variant carriers has been attributed both to the coexistence of α -thalassaemia trait and to the effect of the abnormal variant Hb. Wambua *et al*¹⁷ described significantly lower MCV in HbAS than in HbAA regardless of their α status. No differences in MCV were found between HbAC and HbAA, both of them without α -TT, in the study of Couto *et al*.²⁰ However, Silva *et al* hypothesised that α -TT does not significantly contribute to the microcytosis in HbAC individuals, and the presence of HbC may itself cause a reduction in the RBC size.²¹ A slightly higher degree of microcytosis in HbAS and/or HbAC compared with HbAA has been described by many other authors, but the main cause for their lower MCV was not clear since analysis of the α genes was not performed and the iron status was not assessed.^{23–25}

A different approach to evaluating the size and haemoglobin concentration of erythrocytes is the study of RBC populations. As expected, differences in RBC populations were in agreement with differences in classic parameters related to volume and density. Variant Hb carriers presented lower %MICRO, higher %HYPER and higher M/H. Iron deficiency and α -TT did not influence these differences. To our knowledge, this is the first report of RBC populations in variant Hb carriers.

We found significant differences in RDW between carriers and controls. A possible explanation for the higher RDW in carriers might be that the interactions between the variant Hb and the RBC membrane have different intensity from some erythrocytes to others. This hypothetical heterogeneous effect of the cotransporter alterations may result in different cell sizes depending on the amount of lost water, resulting in a slightly higher degree of anisocytosis.

Although differences in haematological parameters have been reported by many authors, none evaluated the value of the CBC as a screening tool to identify variant Hb carriers. We found four parameters that discriminated accurately between variant Hb carriers and normal controls regardless of the iron status and the presence or absence of α -TT: MCV, RDW, %MICRO and M/H. %MICRO showed the highest diagnostic efficiency (AUC=0.918), followed by MCV (AUC=0.891), M/H (AUC=0.877) and RDW (0.852). A predictive diagnostic model was developed using the cut-off point with the best combination of sensitivity and specificity for each of them. A final score ranging from 0 to 4 points was assigned to every sample, depending on the number of the following criteria it met: MCV <88.4 fL, RDW >13.4%, %MICRO >0.7% or M/H >0.8. We evaluated the diagnostic efficiency of these four parameters in the whole set of data to improve the clinical applicability of the model. According to our results, a score of 4, 3, 2, 1 or 0, resulted in a probability of carrying any structural haemoglobinopathy of 98.3%, 85.2%, 66.7%, 36.3% or 9.6%, respectively. Our model was well calibrated and showed an excellent discrimination (AUC=0.929). Thus, it seems to be an appropriate tool for screening structural haemoglobinopathies.

A score of 3 and 4 should lead to variant Hb investigation, whereas low scores make the diagnosis unlikely. Our model is not structured as a complex mathematical formula, and in our opinion, this facilitates its clinical use. The main aim of this score is to focus attention on those samples requiring further investigation for a complete diagnosis of structural haemoglobinopathy. This easy, quick and cheap strategy may constitute a preliminary screening tool in the investigation of variant Hb carriers without a significant waste of medical resources, so that proper genetic counselling can be given to affected subjects.

HbAS versus HbAC

According to our results, HbS is the most prevalent variant Hb in Madrid (70%), followed by HbC (21%). Since they are by far the two most prevalent structural haemoglobinopathies in our geographical area, it seems reasonable to develop efficient and rapid tools to discriminate between them in daily practice. HbS is produced when a valine is substituted for a glutamic acid at position six in the β chain, whereas HbC arises when the glutamic acid found at position six of the β chain is replaced by lysine.³ Both of them are inherited as an autosomal recessive Mendelian trait.

Initial comparison of HbAS and HbAC showed significant differences in nearly all the parameters. Owing to the high percentage of subjects with coexistent iron deficiency and/or probable α -TT, we decided to analyse these subsets of cases separately. The influence of iron deficiency seemed to have a greater

impact on these differences than α -TT, since many parameters lost their significance when only iron-deficient variant Hb carriers were excluded. This was not the case when only carriers of variant Hb and α -TT were discarded (table 4). In addition, we excluded from the analysis subjects with concomitant iron deficiency and/or α -TT to evaluate the real impact of the Hb phenotype on the haematological laboratory parameters. When only HbAS and HbAC subjects without iron deficiency and α -TT were considered, differences in corpuscular indices and some RBC populations related to volume and haemoglobin concentration remained significant. Normal MCV values were seen in HbAS (87.39 fL) whereas HbAC showed mild microcytosis (82.62 fL, $p<0.001$), and a similar trend was seen in %MICRO (1.32% vs 3.81 respectively, $p=0.003$). A higher degree of hyperchromia was seen in HbAC, with higher values of MCHC (35.68 g/dL vs 33.79 g/dL, $p<0.001$) and %HYPER (3.65% vs 1.03%, $p=0.002$) than in HbAS. As expected, the ratio M/H was much higher in HbAC (19.69 vs 4.83, $p<0.001$), since the numerator (%MICRO) is higher and the denominator (%HYPO) is lower in HbAC subjects than in HbAS subjects.

It has been demonstrated by many authors that the activity of K^+Cl^- cotransporter of the erythrocytes of HbSS, HbCC and HbSC individuals, when compared with normal subjects (HbAA), is increased, leading to unusually dense reticulocytes and RBCs since the K^+ and Cl^- efflux are not compensated by Na^+ influx or Na^+/H^+ exchange.²⁸ In heterozygous subjects, this phenomenon has also been seen, but to a lesser extent.²⁹ The N-terminal fragment of band 3 protein in the membrane of RBCs is highly negatively charged, and binds to the 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) site of Hb.³⁰ Since glutamic acid residues in positions $\beta 6$ and $\beta 7$ (located near the 2,3-DPG pocket) are the only negative charges near the N terminus of the β chain (which interacts with the cytoplasmic domain of band 3), it has been hypothesised that the removal of one negative charge and addition of one or two positive charges may increase the likelihood of binding of the β chain of Hb to band 3.³¹ This would explain why the activity of K^+Cl^- cotransporter of HbAS and HbAC erythrocytes is increased in comparison with other haemoglobinopathies.³¹ RBCs of HbAC subjects are denser than HbAS erythrocytes, possibly because the K^+Cl^- cotransporter may be more active in HbAC subjects, since lysine (HbC) is more positively charged than valine (HbS), and thus its binding to band 3 may be even further increased.

Although differences in corpuscular indices have been reported between HbAS subjects and normal controls^{16–18} and also between HbAC subjects and normal controls,^{19–22} few data are available for the differences between these two variant Hb traits. Only one study compared the MCV of both HbAS and HbAC, which was found to be slightly lower in HbAC.²⁵ However, although evidence of the influence of Hb phenotype on RBC size has been provided, the reason why HbAC erythrocytes are smaller than HbAS erythrocytes remains unknown. In our opinion, the water content of HbAC erythrocytes may be lowered owing to the above-mentioned alterations in cotransporters of the RBC membrane, and this loss of water may be higher than in HbAS, thus contributing to their smaller size.

Five parameters were found to discriminate between HbAS and HbAC regardless of their iron content and the coexistence of α -TT: MCV, MCHC, %MICRO, %HYPER and M/H. The ROC analysis showed that %HYPER discriminated most efficiently between HbAS and HbAC (AUC=0.842), followed by M/H (AUC=0.839) and MCHC (AUC=0.833). They are all density-related parameters, proving that the main difference between HbAS and HbAC erythrocytes is their concentration of Hb.

Original article

Coexisting α -thalassaemia

About one-third of patients with sickle cell disease have coincidental α -TT, which is almost always a result of heterozygosity or homozygosity for the $\alpha^{3,7}$ deletion.³² Concurrent α -TT in subjects with homozygous sickle cell anaemia results in decreased intraerythrocytic concentration of HbS in mature RBCs and in less severe haemolytic anaemia.³³ Since the association of these conditions has important clinical implications, this subset of individuals should be accurately identified in order to perform HPLC or capillary electrophoresis and also molecular analyses. Genetic counselling could therefore be given to them. If HbAS^{16–18} or HbAC^{19–22} subjects have coexisting α -TT, the level of the variant Hb is significantly lower, decreasing in proportion to the severity of the α -TT.^{16 27 33} A higher affinity of β^A chains than β^C and β^S chains for limited quantities of α -globin during haemoglobin tetramer assembly may explain the low levels of these variant Hb in this setting.^{27 34 35} Moreover, the association of α -TT and a structural haemoglobinopathy results in a decrease of MCV and MCH, and there is a strong correlation between the number of deleted α genes and the degree of microcytosis and hypochromia.¹⁶ Our results are in agreement with previously published studies. In HbAS subjects, the coexistence of α -TT resulted in higher RBCs, decreased Hb levels, more microcytosis and hypochromia and anisocytosis (table 5). The same effect of α -TT was seen in all the parameters of HbAC subjects, with the exception of RBCs (table 6). However, none of the previously published studies analysed the erythrocyte subpopulations.

CONCLUSIONS

There are significant differences in most of laboratory parameters between variant Hb carriers and healthy subjects. Although we found a high prevalence of iron deficiency and coexisting α -TT in variant Hb carriers, those differences are independent of their iron and α gene status. The erythrocytes of carriers are smaller, denser and have a slightly higher degree of anisocytosis than erythrocytes of healthy subjects.

Although molecular analysis ('gold standard') or another laboratory technique such as electrophoresis and/or HPLC is mandatory for the diagnosis of structural haemoglobinopathies, a CBC is a quick, cheap and handy test that provides useful information for a presumptive diagnosis of these entities. Structural haemoglobinopathy investigation should be performed if a score of 3 or 4 is seen in subjects belonging to ethnic groups with a high prevalence of variant Hb. If a patient with a variant Hb not yet identified shows hyperchromia (% HYPER >1.15% and/or MCHC >34.55 g/dL and/or M/H >7.3), the diagnosis is more likely to be HbAC.

Coexistence of β -globin chain variants and α -TT leads to reduction in the size and Hb concentration of RBCs, and also a decrease in the quantity of the structurally abnormal Hb compared with that in the simple heterozygotes.

Systematic examination of every chromatogram in the HPLC analyser is essential, since clinically silent variant Hb can be detected.

To our knowledge, this is the first study that evaluates RBC subpopulations in variant Hb carriers. A possible bias in our study is that the majority of carriers came from countries with high prevalence of structural haemoglobinopathy (mostly Africans), whereas most healthy subjects were Caucasian. This might have influenced our results; however, in our opinion, it is not sufficient to explain these highly significant differences. Molecular analysis was not performed in all the samples, which

may be another possible drawback in our study. Sequencing of the β -globin gene was performed only in those samples with a non-conclusive electrophoretic pattern and also when genetic counselling was required. Additionally, no molecular studies were performed to evaluate the α -gene status, but the consideration of coexistent α -TT if the percentage of HbS is <35% and the percentage of HbC is <37% is supported by several publications.

Prospective studies are needed to further confirm the diagnostic efficacy of our predictive model, using the same and different types of laboratory technologies. Efficient prevention programmes could therefore be developed in the near future based on these findings.

In conclusion, although the analysis of haematological laboratory parameters of erythrocytes cannot replace molecular diagnosis in haemoglobinopathies, it can identify variant Hb carriers, provide a presumptive diagnosis, and contribute to our understanding of the physiopathology of these entities.

Take home messages

- Erythrocytes of structural haemoglobinopathy carriers are smaller, denser and have a slightly higher degree of anisocytosis than erythrocytes of healthy subjects.
- Investigation of structural haemoglobinopathy should be performed in subjects belonging to ethnic groups with a high prevalence of variant Hb who meet three or four of the following criteria: MCV<88.4 fL, red blood cell distribution width >13.4%, %MICRO >0.7% and M/H >0.8.
- Erythrocytes of HbAC subjects show more hyperchromia (higher %HYPER and higher MCHC) than erythrocytes of HbAS subjects.
- The coexistence of α -thalassaemia in subjects carrying a variant Hb results in a reduction in the size and Hb concentration of their erythrocytes.

Handling editor Mary Frances McMullin

Contributors DV-R validated the complete blood counts, collected the data and wrote the article. J-MA-D validated the complete blood counts and reviewed the manuscript. F-AG-F validated the high-performance liquid chromatography analysis, helped in the interpretation of the results and reviewed the manuscript. AM carried out the statistical analysis. JV helped in the interpretation of the results and reviewed the manuscript. MS and LA helped in the collection of the data and reviewed the manuscript. MPP, MT, AJ-M, GM and MF-E helped in the collection of samples and reviewed the manuscript. PR, JM-N and FdF did the molecular analysis of the doubtful thalassaemic samples. JL-J and FC reviewed the manuscript.

Competing interests None declared.

Patient consent Obtained.

Ethics approval Ethics committee of Hospital Ramón y Cajal.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- 1 Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood* 2010;115:4331–6.
- 2 Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al. British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol* 2010;149:35–49.
- 3 Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, et al. *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management*. 2nd edn. New York: Cambridge University Press, 2009.

- 4 Giardine B, Borg J, Viennas E, et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acid Res* 2014;42: D1063–9.
- 5 Huisman THJ. The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *Baillieres Clin Haematol* 1993;6:1–30.
- 6 Hardison RC, Chui DH, et al. HbVar: a relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat* 2002;9:225–33.
- 7 Giordano PC, Harteveld CL, Bakker E. Genetic epidemiology and preventive healthcare in multiethnic societies: the hemoglobinopathies. *Int J Environ Res Public Health* 2014;11:6136–46.
- 8 Flint J, Harding RM, Boyce AJ, et al. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol* 1993;6:215–62.
- 9 Kreuels B, Kreuzberg C, Kobbe R, et al. Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia and child growth. *Blood* 2010;115:4551–8.
- 10 Bunn HF. The triumph of good over evil: protection by the sickle gene against malaria. *Blood* 2013;121:20–5.
- 11 Graesdal JS, Gundersen K, Holm B, et al. Thalassemia and sickle-cell disease in Norway. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2001;121:678–80.
- 12 Williams TN, Weatherall DJ. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a011692.
- 13 Piel FB, Tatem AJ, Huang Z, et al. Global migration and the changing distribution of sickle hemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. *Lancet Glob Health* 2014;2:e80–9.
- 14 Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* 2001;79:704–12.
- 15 Streetly A, Clarke M, Downing M. Implementation of the newborn screening programme for sickle cell disease in England: results for 2003–2005. *J Med Screen* 2008;15:9–13.
- 16 Ataúlfo González F, Blázquez C, Ropero P, et al. Association of hemoglobinopathy S and alpha thalassemia. Study of 45 patients. *Med Clin (Barc)* 2005;124: 726–9.
- 17 Wambua S, Mwacharo J, Uyoga S, et al. Co-inheritance of alpha+-thalassaemia and sickle trait results in specific effects on haematological parameters. *Br J Haematol* 2006;133:206–9.
- 18 Güvenc B, Canataoglu A, Unsal C, et al. β -Globin chain abnormalities with coexisting α -thalassaemia mutations. *Arch Med Sci* 2012;8:644–9.
- 19 Liebhaber SA, Cash FE, Cornfield DB. Evidence for posttranslational control of Hb C synthesis in an individual with Hb C trait and alpha-thalassemia. *Blood* 1988;71:502–4.
- 20 Couto FD, De Albuquerque AB, Adorno EV, et al. Alpha-thalassemia 2, 3.7 kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis. *Clin Lab Haematol* 2003;25:29–34.
- 21 Silva NM, Soledade CS, Costa FF, et al. Alpha-thalassemia does not significantly contribute to the low MCV level of Hb C trait. *Hemoglobin* 2002;26:305–9.
- 22 Steinberg MH. Hemoglobin C/alpha thalassaemia: haematological and biosynthetic studies. *Br J Haematol* 1975;30:337–42.
- 23 Hinchliffe RF, Nordcliffe D, Farrar LM, et al. Mean cell hemoglobin concentration in subjects with hemoglobin C, D, E and S traits. *Clin Lab Haematol* 1996;18:245–8.
- 24 Maggio A, Gagliano F, Siciliano S. Hemoglobin phenotype and mean erythrocyte volume in Sicilian people. *Acta Haematol* 1984;71:214.
- 25 Sheehan RG, Frenkel EP. Influence of hemoglobin phenotype on the mean erythrocyte volume. *Acta Haematol* 1983;69:260–5.
- 26 Lepp CA, Bluestein BL. Hemoglobin electrophoresis at alkaline pH on agarose gels. *Clin Chem* 1978;24:936–7.
- 27 Head CE, Conroy M, Jarvis M, et al. Some observations on the measurement of hemoglobin A2 and S percentages by high performance liquid chromatography in the presence and absence of alpha thalassaemia. *J Clin Pathol* 2004;57:276–80.
- 28 Ballas SK, Larner J, Smith ED, et al. The xerocytosis of Hb SC disease. *Blood* 1987;69:124–30.
- 29 Brugnara C, Tosteson DC. Cell volume, K transport, and cell density in human erythrocytes. *Am J Physiol* 1987;252(Pt 1):C269–76.
- 30 Walder JA, Chatterjee R, Steck TL, et al. The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1984;259:10238–46.
- 31 Olivieri O, Vitoux D, Galactéros F, et al. Hemoglobin variants and activity of the (K+Cl-) cotransport system in human erythrocytes. *Blood* 1992;79:793–7.
- 32 Steinberg MH, Embury SH. Alpha-thalassaemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood* 1986;68:985–90.
- 33 Embury SH, Dozy AM, Miller J, et al. Concurrent sickle-cell anemia and alpha-thalassaemia: effect on severity of anemia. *N Engl J Med* 1982;306:270–4.
- 34 Abraham EC, Huisman THJ. Differences in affinity of variant β chains for α chains: a possible explanation for the variations in the percentages of β -chain variants in heterozygotes. *Hemoglobin* 1977;1:861.
- 35 Shaeffer JR, Kingston RE, McDonald MJ, et al. Competition of normal beta chains and sickle hemoglobin beta chains for alpha chains as a post-translational control mechanism. *Nature* 1978;276:631–3.

DISCUSIÓN

Las hemoglobinopatías estructurales y talasemias representan los trastornos genéticos más frecuentes a nivel mundial, y causan uno de los problemas de salud pública más importantes actualmente. Los flujos migratorios de las últimas décadas desde países subdesarrollados hacia países desarrollados han provocado cambios significativos en la distribución mundial de estas patologías. El problema no consiste únicamente en que su prevalencia haya aumentado de forma muy llamativa, sino que, en países desarrollados, el porcentaje de población portadora de al menos uno de estos defectos se espera que siga aumentando en las próximas décadas (*Weatherall et al, 2001; Weatherall, 2010*).

En los países desarrollados, este aumento de prevalencia tan marcado hace que los programas de *screening* sean cada vez más necesarios (*Streetly et al, 2008*). Por otro lado, en los países subdesarrollados, gracias a mejoras sustanciales en la higiene, la nutrición y el acceso a atención sanitaria y medicamentos, se ha conseguido una reducción importante de la mortalidad infantil debida a estos trastornos, aumentando así las posibilidades de supervivencia tanto de homocigotos como de dobles heterocigotos que, de otra forma, hubieran muerto sin haberse diagnosticado (*Weatherall, 2011*).

Nuestro país no ha sido ajeno a estos mencionados cambios migratorios y, en las últimas décadas, la inmigración ha supuesto un notable incremento de la prevalencia de estas alteraciones tanto en sus formas leves (heterocigotos) como en sus formas severas (homocigotos y dobles heterocigotos). De esta forma, este tipo de patologías ha pasado de ser una rareza a formar parte cada vez con mayor frecuencia de la práctica clínica rutinaria, por lo que en un futuro pueden llegar a constituir un

problema importante de salud pública. Este aumento de prevalencia en España ha sido más marcado en las hemoglobinopatías estructurales, mientras que en las talasemias se ha producido en menor proporción.

Este nuevo contexto obliga al desarrollo de nuevas estrategias que permitan la identificación de portadores para darles un consejo genético adecuado e intentar evitar de esta forma, en la medida de lo posible, la aparición de homocigotos y dobles heterocigotos. Y no sólo eso, ya que si se consigue identificar pacientes con enfermedad en una fase presintomática, el inicio precoz de tratamiento puede reducir las complicaciones a largo plazo de estos pacientes.

En cuanto a las posibles estrategias para optimizar el diagnóstico de las hemoglobinopatías, podemos resumirlas en los siguientes puntos:

1. Establecer estudios de prevalencia en las diferentes poblaciones de inmigrantes para conocer con certeza la prevalencia real de cada tipo de hemoglobinopatía o talasemia y definir por tanto grupos de riesgo para cada una de estas patologías.
2. Estandarizar métodos diagnósticos rápidos y sencillos para la correcta identificación de portadores, así como estudios de biología molecular en las situaciones en que sean necesarios como en los casos de consejo genético y en los diagnósticos prenatales.
3. Introducción en los programas de formación de la especialidad temas y protocolos terapéuticos específicos y de posibles complicaciones de estas patologías.

4. Campañas de detección en grupos de riesgo (embarazadas, estudios de neonatos o de sangre de cordón, escolares) para prevenir las formas severas o tratarlas precozmente.

En esta tesis se ha pretendido explorar el valor de la hematimetría como herramienta de diagnóstico de presunción de las hemoglobinopatías, haciendo hincapié en aquellas patologías de la serie eritroide en las que los estudios publicados hasta la fecha no han profundizado lo suficiente o en aquellas en las que hemos considerado que los parámetros del hemograma pueden contribuir a identificar portadores en la práctica clínica habitual.

Dentro de las talasemias, se ha escogido la delta-beta talasemia heterocigota como protagonista principal por considerarse que no está tan estudiada como otros tipos de talasemia desde el punto de vista de la hematimetría. Para analizar los parámetros del hemograma de estos individuos, se han comparado con parámetros de portadores de beta talasemia heterocigota (que es mucho más prevalente, y que a menudo se confunden) y con pacientes deficientes en hierro (principal causa de microcitosis conocida junto con la talasemia). En el primero de los tres artículos que componen esta tesis se ha estudiado el comportamiento de los hematíes maduros de estos tres grupos de pacientes, y en el segundo artículo se ha analizado si los resultados obtenidos en el primero eran extrapolables a los reticulocitos de estos mismos pacientes.

El otro gran grupo de hemoglobinopatías, además de las talasemias, son las hemoglobinopatías estructurales o variantes de Hb, a cuyo estudio se ha dedicado el

tercer artículo. En él se han comparado portadores de Hb variante con controles sanos sin hemoglobinopatía, con el fin de identificar parámetros del hemograma que puedan predecir si un paciente es portador de un defecto estructural de la Hb. Además hemos evaluado las diferencias entre los 2 tipos de hemoglobinopatía estructural más frecuentes en nuestro país, que además son las que tienen una mayor repercusión clínica: Hb S y Hb C.

1. Discusión por objetivos

Objetivo 1: Analizar las diferencias, tanto en los parámetros clásicos del hemograma como en las poblaciones eritrocitarias, entre los portadores de delta-beta talasemia heterocigota, los portadores de beta talasemia heterocigota y pacientes con déficit de hierro.

Objetivo 2: Correlacionar las diferencias encontradas con las características fisiopatológicas de cada una de estas tres entidades.

Dado que el tratamiento de las dos principales causas de microcitosis (talasemia y anemia ferropénica) es bastante diferente, es crucial poder diagnosticar ambas entidades adecuadamente. En este sentido, es fundamental que en todo estudio de microcitosis se incluyan parámetros relacionados con el metabolismo del hierro; si estos parámetros son normales o se encuentran elevados, se debería sospechar una talasemia. En tal caso, si los valores de Hb A₂ están aumentados, independientemente del valor de Hb F, el diagnóstico sería β -talasemia. Sin embargo, si los valores de Hb A₂

son normales, es imprescindible cuantificar la Hb F, puesto que de lo contrario no podemos precisar el diagnóstico. Tanto la α -talasemia como la $\delta\beta$ -talasemia presentan niveles normales de Hb A₂ pero, mientras la α -talasemia tiene niveles normales de Hb F, en la $\delta\beta$ -talasemia los niveles de Hb F están elevados. Por este motivo, es imprescindible realizar la determinación de Hb A₂ y Hb F de forma conjunta, ya que, en caso contrario, la $\delta\beta$ -talasemia no se va a poder detectar.

Debido a este motivo, la prevalencia real de la $\delta\beta$ -talasemia podría estar infraestimada, por lo que es necesario el desarrollo de estrategias diagnósticas que nos ayuden a identificar a los portadores de esta alteración. En este sentido cobra una gran importancia la hematimetría, cuyo impacto en el diagnóstico de presunción de diversas patologías eritroides ha quedado sobradamente demostrado. De una forma sencilla, barata y rápida, alguien suficientemente entrenado puede identificar con un alto grado de probabilidad a portadores de talasemia. Sin embargo, diferenciar entre portadores de β -talasemia y $\delta\beta$ -talasemia no es tan sencillo.

En la literatura se pueden encontrar varios estudios en los que se han estudiado las diferencias fenotípicas entre β -talasemia y $\delta\beta$ -talasemia (*Aslan et al, 2002; Donoghue, 1987; Juncá Piera et al, 1990; Miguel Sosa et al, 1990; Fernández Valle et al, 1991; Jiménez et al, 1995; Vayá et al, 1983*). El único parámetro en el que se han encontrado diferencias significativas de forma unánime en todos ellos es el ADE, que está más elevado en los portadores de $\delta\beta$ -talasemia. Además de las diferencias en el grado de anisocitosis, algunos autores también han observado diferencias significativas en otros parámetros, como por ejemplo Vayá y colaboradores, que reportaron mayor VCM y

CHCM en portadores de $\delta\beta$ -talasemia, mientras que Fernández Valle y colaboradores únicamente vieron esas diferencias en el VCM.

La intención del primero de los estudios que conforman esta tesis ha sido, no sólo confirmar las mencionadas diferencias en parámetros clásicos del hemograma entre estas dos entidades, sino ir un paso más allá e intentar encontrar diferencias en los nuevos parámetros hematológicos, e incluso intentar demostrar si la anisocitosis en la $\delta\beta$ -talasemia puede tener relación o no con alguna característica específica de estos pacientes.

Para ello, en dicho artículo, se compararon tanto los parámetros clásicos del hemograma como los nuevos parámetros hematológicos de serie roja proporcionados por el analizador Advia 2120 (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY) en un total de 553 casos de microcitosis (74 $\delta\beta$ -talasemia, 272 β -talasemia y 207 individuos con ferropenia con o sin anemia).

Al comparar los casos de $\delta\beta$ -talasemia y β -talasemia, se observaron diferencias estadísticamente significativas no sólo en el ADE (18.79% en $\delta\beta$ -talasemia y 16.04% en β -talasemia, $p < 0.001$) sino también en el VCM (66.39 vs 64.82 fl, $p < 0.001$), HCM (20.73 vs 20.04 pg, $p < 0.001$), y CHCM (31.16 vs 30.66 g/dl, $p = 0.03$). No se encontraron diferencias significativas en el número total de hematíes, Hb, %MACRO, %MICRO, %HIPO e %HIPER.

Se evaluó la capacidad diagnóstica de todos los parámetros mediante el análisis de la curva ROC y su área bajo la curva (ABC), y el ADE demostró ser el mejor parámetro para discriminar entre estas dos entidades (ABC 0.914), y el punto de corte de 17.35% fue el que demostró tener un mejor balance de sensibilidad (84.5%) y especificidad

(85.9%). El ABC de otros parámetros que habían demostrado tener diferencias estadísticamente significativas no fue tan buena; así, por ejemplo el ABC de HCM fue de 0.668 y el de VCM de 0.662.

También quedó demostrado que las diferencias en los valores de ADE fueron estadísticamente significativas cuando se compararon β -talasemia con Hb F menor de 2% (15.74%), β -talasemia con Hb F mayor de 2% (17.09%), y $\delta\beta$ -talasemia (18.79%) ($p<0.001$). Estas diferencias en tres subgrupos de individuos con distinta cantidad de Hb F plantearon la cuestión de la posible influencia de la Hb F en el grado de anisocitosis de dichos individuos.

El coeficiente de Pearson demostró una muy buena correlación entre el porcentaje de Hb F y el ADE ($r=0.762$, $p<0.001$) y también entre el valor absoluto de Hb F y el ADE ($r=0.661$, $p<0.001$). Esto demuestra que el grado de anisocitosis de estos pacientes está muy relacionado con la cantidad de Hb F. A pesar de que este no era uno de los objetivos de esta tesis, se trata de un hallazgo relevante ya que esta relación no se había reportado hasta la fecha.

Aunque las razones se desconocen, se sabe que los precursores eritroides de la $\delta\beta$ -talasemia muestran una distribución heterogénea de la Hb F, y este fenómeno puede ser demostrado mediante el test de Kleihauer (*Kleihauer et al, 1957*). Además, la citometría de flujo también ha demostrado esta distribución heterocelular de la Hb F en la $\delta\beta$ -talasemia, a diferencia de la PHHF donde el patrón de distribución de la Hb F es homocelular (*Hoyer et al, 2002*). En este estudio no se han realizado ni el test de Kleihauer ni estudios de citometría de flujo. A pesar de que las diferencias en el ADE entre ambas entidades han sido reportadas por varios autores, ninguno de los

mencionados estudios analizó si la Hb F tenía o no influencia en el ADE. Nuestros resultados han demostrado que el ADE, es decir el grado de anisocitosis, de los pacientes con talasemia (β y $\delta\beta$) está fuertemente influido por el porcentaje de Hb F que presentan. Por lo tanto, si un individuo con datos de laboratorio sugestivos de talasemia presenta además un ADE elevado, debemos sospechar una $\delta\beta$ -talasemia, o bien una β -talasemia con niveles elevados de Hb F. En ocasiones, aunque es infrecuente, los portadores de $\delta\beta$ -talasemia pueden presentar valores de ADE normales o levemente elevados. En nuestro estudio, hubo únicamente 3 casos de los 74 (4.05%) que presentaron un $ADE \leq 16.5\%$, y en dichos casos la media de Hb F fue menor (2.46%). El aumento de Hb F en la $\delta\beta$ -talasemia se debe a una sobreexpresión de los genes gamma por un mecanismo de pérdida de competencia de los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes beta (*Sankaran et al, 2011*). Como consecuencia de la delección de los genes delta y beta, esos factores de transcripción interactúan con las zonas promotoras de los genes gamma. La expresión fenotípica de la Hb F depende del tamaño y la localización de las secuencias delecionadas. Además, la pérdida de regiones reguladoras de la expresión de los genes gamma también puede influir en la síntesis de Hb F (*Katsantoni et al, 2003*).

Los portadores de talasemia se caracterizan por un incremento en el número total de hematíes, como resultado del aumento crónico de la eritropoyesis, con niveles normales o muy levemente disminuidos de Hb. La menor hemoglobinización y la disminución de síntesis de cadenas de globina provocan un mayor número de divisiones de los precursores eritroides, siendo esta la explicación de la microcitosis de estos individuos. En los portadores de $\delta\beta$ -talasemia, el aumento en la síntesis de cadenas gamma compensa en parte el déficit de síntesis de cadenas beta. Por ese

motivo, la hemoglobinización de los precursores $\delta\beta$ parece estar ligeramente aumentada en comparación con los precursores β , lo que explica que tengan una CHCM mayor, y, consecuentemente, sufran un menor número de divisiones y tengan un VCM mayor que los portadores de β -talasemia.

La HCM se obtiene a partir de mediciones precisas tanto del número total de hematíes como de la Hb. Muchos autores recomiendan utilizar la HCM en lugar del VCM para el *screening* de talasemia, debido a que la estabilidad de la HCM durante el tiempo de almacenamiento de las muestras no varía mientras que la del VCM sí lo hace (*Ryan et al, 2010; Brugnara et al, 2013*). En nuestra serie, la HCM de los portadores de $\delta\beta$ -talasemia fue mayor que la de los portadores de β -talasemia, y la explicación a este hecho puede ser tanto su mayor hemoglobinización como su tamaño ligeramente superior.

En una segunda fase de este estudio, se intentó validar la capacidad predictiva del ADE, para lo cual se identificaron de forma prospectiva 259 nuevos portadores de rasgo talasémico (218 β y 41 $\delta\beta$). Utilizando el punto de corte de 17.35% para el ADE, el 84.9% de los portadores de β -talasemia (185 de 218) y el 90.2% de los portadores de $\delta\beta$ -talasemia (37 de 41) fueron correctamente identificados. Estos resultados confirman la capacidad del ADE para discriminar entre ambas entidades. El hecho de que haya un porcentaje ligeramente inferior de portadores de β -talasemia adecuadamente identificados se puede explicar por el hecho de que algunos de ellos presentaran una sobreexpresión de los genes que codifican las cadenas gamma, ya sea por alteraciones moleculares asociadas bien en los promotores de dichos genes o bien por mutaciones en otros determinantes moduladores de su expresión fuera del cluster

de los genes beta. En estos casos se produce un ADE más elevado, haciéndoles parecer portadores de $\delta\beta$ -talasemia. Sería de gran interés, por tanto, que se encontrase un parámetro hematológico que pudiera discriminar entre los portadores de β -talasemia con una mayor y menor expresión de Hb F, cuestión que podría resolverse en el futuro con estudios similares dirigidos a individuos portadores de β -talasemia seleccionados. La sobreexpresión de genes gamma constituye un modulador muy importante en expresión fenotípica de las formas homocigotas o dobles heterocigotas de beta talasemias. De esta forma identificar casos de beta talasemia heterocigota portadores de estas alteraciones puede tener importancia a la hora de realizar el consejo genético. En este segundo análisis, no incluimos ni el VCM, ni HCM ni CHCM, ya que ninguno de ellos había demostrado una precisión diagnóstica (área bajo la curva) lo suficientemente buena.

Estos resultados han confirmado que los portadores de $\delta\beta$ -talasemia tienen un ADE significativamente mayor que los portadores de β -talasemia (18.79% vs 16.04%, $p<0.001$) y que los hematíes $\delta\beta$ son menos microcíticos y menos hipocrómicos que los hematíes β . Creemos que este es el primer estudio en el que la tecnología del analizador Advia 2120 se ha aplicado a portadores de $\delta\beta$ -talasemia y β -talasemia simultáneamente. En estudios previos de estas 2 entidades, el hemograma fue realizado en analizadores Coulter (*Donoghue, 1987; Juncá Piera et al, 1990; Miguel Sosa et al, 1990*) o H*2 (*Jiménez et al, 1995*), mientras que en otros trabajos no se hizo alusión a la tecnología utilizada (*Fernández Valle et al, 1991; Aslan et al, 2002*).

A pesar de haberse demostrado que la $\delta\beta$ -talasemia es menos microcítica y menos hipocrómica que la β -talasemia, no se encontraron diferencias estadísticamente

significativas en las diferentes poblaciones eritrocitarias entre ambas. Sin embargo, antes de que aplicáramos la corrección de Bonferroni para evitar el posible efecto de las comparaciones múltiples en la alta significación estadística alcanzada, sí habíamos visto que el %HIPER era significativamente mayor y el %HIPO significativamente menor en $\delta\beta$ -talasemia. Por tanto, es posible que con estudios que tengan un tamaño muestral mayor se demuestre que dichos parámetros puedan tener un papel importante en el diagnóstico diferencial.

Por otro lado, también hemos comparado cada uno de estos dos tipos de talasemia con pacientes con ferropenia. En la comparación de β -talasemia frente a ferropenia, varios estudios han demostrado que los portadores de β -talasemia tienen un mayor recuento total de hematíes, mayores niveles de Hb, mayor CHCM, y menor VCM y ADE que los pacientes con ferropenia (*Jiménez et al, 1995; Urrechaga, 2009; Urrechaga et al, 2011A*). En este estudio se han encontrado diferencias estadísticamente significativas no sólo en todos los parámetros clásicos del hemograma, sino también en las poblaciones eritrocitarias ($p < 0.001$ en todos los parámetros). Resultados similares han sido reportados previamente por Urrechaga y colaboradores (*Urrechaga, 2009; Urrechaga et al, 2011A*) y Jiménez y colaboradores (*Jiménez et al, 1995*), aunque en este último estudio los portadores de β y $\delta\beta$ -talasemia fueron considerados como un único grupo.

A pesar de que la CHCM fue menor en los pacientes con ferropenia, la HCM de los ferropénicos fue mayor que en los portadores de β -talasemia. Esto supone que, probablemente, la HCM está influenciada no sólo por la hemoglobinización sino especialmente por el volumen de los hematíes.

El eritrograma basado en volumen/concentración de Hb que proporciona el Advia 2120 muestra patrones característicos tanto de ferropenia como de talasemia, por lo que permite realizar de forma fácil un diagnóstico de presunción a simple vista (Urrechaga, 2009). Además de dichos patrones, el analizador nos proporciona valores numéricos de las poblaciones eritrocitarias según el volumen (%MACRO y %MICRO) y la concentración de Hb (%HIPER, %HIPO). Como era de esperar, el %MICRO fue mucho mayor en el grupo de β -talasemia (34.27%) que en el de ferropenia (18.41%; $p<0.001$), mientras que en el %HIPO se observó un comportamiento opuesto (β -talasemia 21.36%, ferropenia 34.18%; $p<0.001$). Un parámetro que, hasta la fecha, no se había estudiado en estos dos grupos de pacientes es %MACRO. Una posible explicación de que el %MACRO esté más elevado en pacientes ferropénicos podría ser, por un lado, un recuento de reticulocitos mayor (que son de mayor tamaño) al incluirse en este grupo algunos pacientes con sangrado. Por otro lado, el hierro juega un papel clave en la síntesis de ADN formando parte de la enzima ribonucleótido reductasa, que cataliza la formación de ribonucleótidos (Elledge et al, 1992). Por lo tanto, la deficiencia de hierro produciría un menor número de divisiones de los precursores eritroides y un cierto grado de macrocitosis en comparación con los portadores de β -talasemia.

En estudios previos, el recuento total de hematíes (d'Onofrio et al, 1992) y el %MICRO (Jiménez et al, 1995; Urrechaga et al, 2009; Urrechaga et al, 2011A) han demostrado ser los parámetros con mayor capacidad de discriminación entre estos dos grupos hasta la fecha. Según nuestros datos el mayor poder discriminativo fue el del VCM (ABC=0.879), que fue superior al del número total de hematíes (ABC=0.871) y el del %MICRO (ABC=0.840), segundo y tercer parámetros con mayor ABC, respectivamente.

En comparación a estudios previos, la capacidad discriminatoria del %MICRO fue

ligeramente inferior a la esperada (teniendo en cuenta que el VCM fue el parámetro con mayor capacidad discriminativa), aunque su ABC fue lo suficientemente buena como para considerarlo un parámetro fiable a la hora de discriminar entre ambas patologías.

De forma similar a la comparación descrita entre el grupo de ferropenia y el grupo de β -talasemia, también encontramos diferencias estadísticamente muy significativas en todos los parámetros entre el grupo de $\delta\beta$ -talasemia y el grupo de deficientes en hierro ($p<0.001$ en todos los parámetros). Los portadores de $\delta\beta$ -talasemia presentaron mayor recuento total de hematíes, mayores niveles de Hb, mayor CHCM, menor VCM y mayor ADE que los pacientes con ferropenia. El parámetro más eficaz a la hora de discriminar entre $\delta\beta$ -talasemia y ferropenia fue el %HIPER, con un ABC de 0.910, superior a la del número total de hematíes (ABC=0.856) y CHCM (ABC=0.854). La mayor parte de los hematíes en individuos con déficit de hierro son hipocrómicos, mientras que la hemoglobinización de los hematíes en portadores de $\delta\beta$ -talasemia está incrementada por el aumento de síntesis de cadenas gamma. Estos dos factores pueden servir para explicar las diferencias en el %HIPER entre estos dos grupos. A pesar de que ambas entidades suelen cursar con ADE elevado, los distintos estudios publicados hasta la fecha han mostrado diferencias inconsistentes entre ambas en cuanto a dicho parámetro. En nuestro estudio, el ADE fue mayor en $\delta\beta$ -talasemia (18.79 vs 17.59, $p<0.001$), de forma similar a las diferencias reportadas por Juncá y colaboradores. Sin embargo, Sosa y colaboradores no encontraron diferencias entre ambas. La discrepancia entre los distintos estudios podría estar en relación con diferentes criterios de selección de los pacientes incluidos y la variedad de tamaños muestrales de cada uno de ellos.

Cuando en la consulta nos encontremos ante un paciente con anemia macrocítica cuyos índices corpusculares sean compatibles con un posible rasgo talasémico, es importante tener en mente la posibilidad de que se trate de una $\delta\beta$ -talasemia, especialmente en áreas geográficas como la nuestra. No es ni mucho menos tan prevalente como la β -talasemia, la α -talasemia (no incluida en este estudio) o la anemia ferropénica, pero sí lo suficiente como para diagnosticarla con cierta frecuencia si la tenemos en consideración en el diagnóstico diferencial. El manejo clínico de estas patologías es bastante diferente, por lo que son necesarias herramientas diagnósticas que nos permitan diferenciarlas. El consejo genético que le tenemos que dar a un portador de $\delta\beta$ -talasemia heterocigota es diferente del que le daremos a un portador de β -talasemia heterocigota. Si un individuo hereda un alelo $\delta\beta$ de cada progenitor, es decir tiene una $\delta\beta$ -talasemia homocigota, se va a comportar como una talasemia intermedia, lo que significa que podrá realizar una vida más o menos normal pero necesitará transfusiones de manera ocasional dependiendo de la severidad de su anemia. Por otro lado, los sujetos con α -talasemia homocigota o doble heterocigota van a presentar una α -talasemia mayor con necesidad de transfusiones periódicas para poder sobrevivir.

Tanto los parámetros clásicos del hemograma como algunos de los nuevos parámetros de laboratorio de serie roja, como son las poblaciones eritrocitarias, han confirmado en este estudio su utilidad a la hora de seleccionar muestras con microcitosis para estudio de talasemia, y alguno de estos parámetros (ADE) ha demostrado poder discriminar de forma eficaz entre β y $\delta\beta$ -talasemia.

Hasta el momento actual, este es el primer trabajo en el que se estudian las poblaciones eritrocitarias en individuos con $\delta\beta$ -talasemia y el primero en el que se demuestra correlación entre el porcentaje de Hb F y el grado de anisocitosis en estos casos. Es cierto que no se ha realizado estudio molecular en nuestros pacientes (salvo en unos pocos casos en los que se secuenció el gen beta porque el estudio de HPLC no era del todo concluyente), pero ante un caso con microcitosis e hipocromía, tener una Hb A₂ elevada (en el caso de la β -talasemia) o una Hb A₂ normal y una Hb F elevada (en el caso de la $\delta\beta$ -talasemia) son suficientes para establecer el diagnóstico.

Objetivo 3: Comprobar si las diferencias encontradas en los parámetros de hematíes maduros se observan también en los reticulocitos de estos dos grupos de pacientes.

Tras haber analizado las características de los hematíes maduros de estos 3 grupos diferentes de individuos con microcitosis, se planteó un segundo estudio, encaminado a comprobar si todas esas diferencias encontradas en los hematíes maduros podían observarse también en los reticulocitos de esos mismos sujetos.

Los reticulocitos son los primeros precursores eritroides liberados a la circulación en condiciones normales, y circulan por el torrente sanguíneo solamente 1-2 días (*Mast et al, 2002*). Debido a su corta vida en la circulación en comparación con los hematíes maduros (120 días aproximadamente), los parámetros reticulocitarios constituyen herramientas más fiables para evaluar la actividad eritropoyética de la médula ósea a tiempo real, dado que los cambios en la eritropoyesis pueden ser detectados antes (*Urrechaga et al, 2011B*). El estudio de reticulocitos ha cobrado un gran interés e

importancia en los últimos años desde el desarrollo de analizadores hematológicos que utilizan tinciones específicas para el ARNm, permitiendo así recuentos muy precisos incluso cuando la cantidad de reticulocitos es muy pequeña (*Urrechaga et al, 2011B*).

Algunos parámetros reticulocitarios han demostrado tener un papel muy prometedor en el estudio de diversas patologías eritroides. Por ejemplo, el CHr ha sido utilizado para el diagnóstico y seguimiento de la anemia ferropénica (*Mast et al, 2008*), para predecir déficit de hierro en sujetos sanos (*Brugnara et al, 1999*), para discriminar entre anemia ferropénica y anemia de trastornos crónicos (*Rehu et al, 2011*) y para diferenciar portadores de talasemia de individuos sanos (*Skarmoutsou et al, 2003; Vicinanza et al, 2005; Krügnier et al, 2006; Wagner et al, 2011*) y con déficit de hierro (*Urrechaga et al, 2011A; Urrechaga et al, 2011B; d'Onofrio et al, 1995; Noronha et al, 2005; Bartels et al, 2006; Chouliaras et al, 2010; Schoorl et al, 2012; Sudmann et al, 2012; Cortellazzi et al, 2003; Urrechaga et al, 2015; Ceylan et al, 2007*). Además, se puede obtener información cuantitativa sobre los reticulocitos inmaduros basándonos en la cantidad de ARNm que tienen, pudiendo ser de utilidad los parámetros de maduración obtenidos en el diagnóstico diferencial de las anemias (*Noronha et al, 2005; Urrechaga et al, 2015*).

En este segundo estudio, se empezó comparando a los portadores de $\delta\beta$ -talasemia y β -talasemia. El parámetro más relevante en el estudio de hematíes maduros había sido el ADE, por lo que se pretendía confirmar si esa capacidad discriminatoria entre ambas entidades también la tenía el ADEr. Los reticulocitos de portadores de $\delta\beta$ -talasemia tuvieron un ADEr superior a los de portadores de β -talasemia (15.03% vs 13.82%, $p<0.001$). Por lo tanto, la anisocitosis descrita en la serie roja más madura también se

puede observar en sus más inmediatos precursores, y la explicación a este fenómeno es la ya mencionada distribución heterocelular de la Hb F en los reticulocitos. Las diferencias en ADEr también fueron observadas entre sujetos β -talasemia con y sin elevación de la Hb F (artículo 2, figura 1). Es decir, el ADEr está influenciado por el porcentaje de Hb F en los portadores de β -talasemia y $\delta\beta$ -talasemia. Sin embargo, la correlación entre estos 2 parámetros, aunque fue positiva ($r=0.551$, $p<0.001$), parece ser inferior a la observada en hematíes maduros.

En la línea de los resultados obtenidos en el estudio de hematíes maduros de estos pacientes, también se confirmaron estas diferencias no sólo en el ADEr, sino también en los parámetros que hacen referencia al tamaño y cantidad de Hb de los reticulocitos. En los portadores de $\delta\beta$ -talasemia, el volumen corpuscular reticulocitario (VCMr) fue ligeramente superior al observado en los portadores de β -talasemia (88.30 vs 85.50 fl, $p<0.001$), también lo fue el CHr (23.68 vs 22.66 pg, $p<0.001$). El razonamiento que explica estas diferencias es el mismo que en el primer estudio. Los precursores eritroides (en este caso los reticulocitos) de estos pacientes son ya de por sí microcíticos, debido a un mayor número de divisiones por la síntesis disminuida de cadenas de globina y la consecuente disminución de su hemoglobinización. En el caso de los portadores de $\delta\beta$ -talasemia, el aumento de síntesis de cadenas gamma compensa en parte este efecto y, por lo tanto, tienen un tamaño y una hemoglobinización ligeramente superior.

El parámetro CHr se obtiene mediante el producto del volumen y la concentración de Hb. Cuando los reticulocitos maduran a hematíes maduros, se produce un aumento de su concentración de Hb al mismo tiempo que experimentan una disminución de su

volumen. Por este motivo, CHr parece ser un parámetro más estable que la CHCMr (*Mast et al, 2008*). A pesar de que en este estudio las diferencias en CHCMr no fueron significativas, probablemente debido al tamaño de la muestra (no en todos los casos de $\delta\beta$ -talasemia se pudo hacer el estudio reticulocitario), sí que observamos valores ligeramente superiores de CHCMr en $\delta\beta$ -talasemia (26.93 vs 26.70 g/dl). En la literatura encontramos varios estudios en los que se ha demostrado que CHr es capaz de discriminar portadores de talasemia de sujetos sanos y también de deficientes en hierro. Sin embargo, no hemos encontrado publicados estudios en los que se evalúe dicho parámetro en $\delta\beta$ -talasemia. Por ejemplo, Skarmoutsou y colaboradores (*Skarmoutsou et al, 2003*) demostraron diferencias significativas en CHr entre portadores de β -talasemia silente, β^+ -talasemia y β^0 -talasemia. En dicho trabajo se observó que había correlación entre CHr y el grado de desequilibrio de cadenas de globina: es decir, el grupo de β^0 -talasemia presentó los valores más bajos. No disponemos de datos en los diferentes subtipos de β^0 -talasemia ya que en nuestro trabajo no se realizó el estudio molecular en la gran mayoría de dichos casos.

Dentro de los reticulocitos, el analizador Advia 2120 es capaz de dividirlos en tres subgrupos según la cantidad de ARNm que posean, de tal forma que, cuanto mayor sea contenido en ARNm, más inmaduros son. Los parámetros que nos proporciona esta tecnología son: H-RTC (alto contenido en ARNm, los más inmaduros), M-RTC (contenido medio) y L-RTC (bajo contenido en ARNm, los inmediatamente anteriores a los hematíes maduros). En las ocasiones en las que la actividad eritropoyética de la médula ósea está aumentada, se observa un mayor porcentaje de reticulocitos inmaduros en sangre periférica (*de Lima et al, 2003*). Al analizar las subpoblaciones reticulocitarias en β y $\delta\beta$ -talasemia, no encontramos diferencias significativas en

ninguno de estos parámetros, lo que probablemente refleje que no haya diferencias significativas en la actividad eritropoyética entre los sujetos con estas dos alteraciones.

En este segundo estudio también se compararon los parámetros reticulocitarios de estos 2 tipos de talasemia con los de pacientes con ferropenia. En el caso de la comparación entre los grupos β -talasemia y ferropenia, se había observado en el primer estudio que los hematíes maduros de los portadores de β -talasemia tenían menor VCM, mayor CHCM y menor ADE que los hematíes ferropénicos (*Jiménez et al, 1995; d'Onofrio et al, 1992; Urrechaga et al, 2008; Urrechaga, 2009; Urrechaga et al, 2011C*). En cuanto al tamaño y la concentración de Hb reticulocitarios, se obtuvo el mismo comportamiento que el de los hematíes maduros de estos dos grupos, ya que el VCMr de los portadores de β -talasemia fue menor (85.50 fl) que el de los sujetos ferropénicos (94.95 fl, $p<0.001$), y la CHCMr fue mayor (26.70 vs 25.39 g/dl, $p<0.001$). Es decir, al igual que ocurre en los hematíes maduros, los reticulocitos talasémicos son más microcíticos que hipocrómicos y los reticulocitos ferropénicos son más hipocrómicos que microcíticos. El desequilibrio en la síntesis de cadenas de globina y el exceso de cadenas alfa libres producen daño oxidativo de la membrana, pérdida de potasio y una deshidratación relativa en los precursores eritroides de los portadores de β -talasemia. Por otro lado, el hierro forma parte de la ribonucleótido reductasa, por lo que desempeña un importante papel en la síntesis de ADN (*Elledge et al, 1992*). Esto hace que, debido a que los precursores eritroides se dividan menos, el déficit de hierro produzca un cierto grado de macrocitosis en comparación con la β -talasemia.

A pesar de que la CHCMr fue menor en los pacientes con déficit de hierro, dichos pacientes tenían un valor de CHr medio superior a los portadores de β -talasemia (24.05 vs 22.66 pg, $p < 0.001$). Esto quiere decir que CHr parece estar influenciado por la hemoglobinización y, sobre todo, por el tamaño de los reticulocitos. Estos resultados son similares a los reportados por Vicinanza y colaboradores (Vicinanza *et al*, 2005), Chouliaras y colaboradores (Chouliaras *et al*, 2010), Urrechaga y colaboradores (Urrechaga *et al*, 2015) y Ceylan y colaboradores (Ceylan *et al*, 2007), habiendo utilizado todos ellos la misma tecnología de analizadores hematológicos que se utilizó en el presente trabajo. Sin embargo, algunos de estos autores (Chouliaras *et al*, 2010; Ceylan *et al*, 2007) reportaron niveles de sensibilidad y especificidad insuficientes de CHr para discriminar entre ambas entidades. Los valores de CHr deben ser interpretados en el contexto global de la fisiología eritrocitaria del paciente, debido a sus conocidas limitaciones diagnósticas en pacientes con transfusiones sanguíneas recientes, aquellos que están recibiendo tratamiento con hierro, y en aquellos con déficit concomitante de folato y/o vitamina B₁₂ (Mast *et al*, 2008). En este sentido, Vicinanza y colaboradores (Vicinanza *et al*, 2005) propusieron Δ CHr como un parámetro más preciso que CHr, dado que CHr parece ser menos eficaz a la hora de discriminar pacientes con microcitosis o macrocitosis marcadas (Brugnara *et al*, 1999). Según proponen estos autores, Δ CHr se puede calcular como la diferencia entre el CHr medido y el CHr esperado para su correspondiente VCMr (Δ CHr = CHr - CHr-e). Existe, además, un parámetro similar que proporcionan los autoanalizadores Sysmex (Sysmex, Kobe, Japón) llamado Equivalente de Hemoglobina Reticulocitario (Ret He, también llamado RET-Y), similar pero no idéntico a CHr, que también ha sido evaluado en β -talasemia y ferropenia (Urrechaga *et al*, 2011A; Urrechaga *et al*, 2011B; Sudmann *et al*,

2012; Noronha et al, 2005; Bartels et al, 2006). En el trabajo de Noronha y colaboradores y en el de Bartels y colaboradores no se encontraron diferencias en este parámetro entre ambos grupos de pacientes. Sin embargo, otros autores sí han reportado diferencias en Ret He entre β -talasemia y ferropenia (Urrechaga et al, 2011A; Urrechaga et al, 2011B). Incluso se ha incluido este parámetro en un algoritmo diagnóstico, junto con el recuento total de hematíes y la ferritina, para discriminar entre β -talasemia y ferropenia (Sudmann et al, 2012).

Parece sorprendente, a priori, que el ADEr de los portadores de β -talasemia sea superior al del grupo de ferropenia (13.82% vs 12.80%, $p < 0.001$), al contrario de lo que ocurre con los hematíes maduros, en los que se observa un mayor grado de anisocitosis en los pacientes con ferropenia (d'Onofrio et al, 1992; Urrechaga et al, 2008; Urrechaga, 2009; Urrechaga et al, 2011C). Para encontrar una explicación plausible a este fenómeno conviene que nos fijemos en cómo se calcula el ADEr. Se define este parámetro como el coeficiente de variación del VCMr, definido como el cociente de su desviación estándar entre su media. Como el denominador de dicha fórmula, es decir el VCMr, es mayor en los pacientes ferropénicos, su ADEr es menor. Además, el tamaño de los reticulocitos es mayor que el de los hematíes maduros, por lo que el ADEr es ligeramente inferior al ADE en ambas patologías. En este contexto, la desviación estándar probablemente sea el parámetro estadístico más preciso dentro de las medidas de dispersión, y está más elevada en el grupo de ferropenia (1.45 vs 1.37).

En el grupo de pacientes con ferropenia se observó una mayor cantidad de reticulocitos inmaduros que en el grupo de β -talasemia, lo que sugiere una actividad

eritropoyética aumentada, resultados similares a los comunicados por Noronha (Noronha et al, 2005) y Urrechaga (Urrchaga, 2015; Urrechaga et al, 2011B). Es llamativo el hecho de que el número total de reticulocitos sea, en cambio, mayor en el grupo de β -talasemia, dato que concuerda con estudios previos (Noronha et al, 2005; Bartels et al, 2006; Urrechaga et al, 2011B). Es decir, los pacientes con ferropenia tienen más reticulocitos inmaduros que los portadores de β -talasemia, pero menos reticulocitos totales. Por lo tanto, algunos de ellos no son liberados al torrente sanguíneo, lo que nos sugiere un cierto grado de eritropoyesis ineficaz mayor en el grupo de ferropenia. Una posible hipótesis que explicaría la mayor proporción de reticulocitos inmaduros en los sujetos deficientes en hierro podría ser una mayor expresión del ARNm del receptor soluble de la transferrina (RST) (Punnonen et al, 1997). En respuesta a una cantidad insuficiente de hierro unido a transferrina, la síntesis de RST aumenta proporcionalmente a los requerimientos celulares (Cook, 1999). Por lo tanto, un aumento de los niveles plasmáticos del RST podría reflejar un aumento de los precursores eritroides (Skarmoutsou et al, 2002) o bien una mayor expresión en la membrana celular de los precursores eritroides del receptor de la transferrina (RT). Además, el RST ha demostrado tener correlación positiva con los niveles de Hb A₂ (que refleja el grado de desequilibrio de cadenas de globina) en pacientes con β -talasemia (Skarmoutsou et al, 2002). Sin embargo, De Lima y Grotto (De Lima et al, 2003) no hallaron diferencias significativas en RST y reticulocitos inmaduros entre β -talasemia y ferropenia. En nuestro estudio no se ha realizado determinación del RST al no estar disponible en nuestro laboratorio, por lo que no se ha podido comprobar esta posible relación.

Para concluir este segundo estudio, quisimos analizar las diferencias en los parámetros reticulocitarios de los portadores de $\delta\beta$ -talasemia y los pacientes con déficit de hierro. Observamos diferencias significativas en todos los índices corpusculares, con la excepción de CHr. Los reticulocitos $\delta\beta$ fueron más pequeños (VCMr 88.30 fl) y más densos (CHCMr 26.93 d/dl) que los reticulocitos ferropénicos (VCMr 94.95 fl y CHCMr 25.39 g/dl, $p<0.001$). La distribución heterogénea de la Hb F explica el mayor grado de anisocitosis (ADEr 15.03% vs 12.80%, $p<0.001$) de los reticulocitos $\delta\beta$. El aumento de hemoglobinización de los precursores eritroides de la $\delta\beta$ -talasemia hace que sufran un menor número de divisiones, lo que puede explicar las diferencias de tamaño celular.

Sin embargo, ninguno de los parámetros de maduración reticulocitarios mostró diferencias significativas entre estos dos grupos, con la excepción de H-R. Los reticulocitos con alto contenido en ARNm fueron más numerosos en el grupo de sujetos ferropénicos ($41.29\times 10^9/l$ vs $6.05\times 10^9/l$, $p<0.001$), confirmando que la expansión de la eritrona es mayor en pacientes con déficit de hierro. Al igual que ocurrió con los portadores de β -talasemia, el recuento total de reticulocitos del grupo de ferropenia fue inferior al del grupo de $\delta\beta$ -talasemia a pesar de tener más reticulocitos inmaduros, lo que sugiere la teoría de un posible mayor grado de eritropoyesis ineficaz, aunque también podría ser debido a una mayor expresión del ARNm del RT. El hecho de no haber encontrado diferencias significativas en el resto de parámetros de inmadurez reticulocitaria puede ser debido al pequeño tamaño muestral del grupo de $\delta\beta$ -talasemia.

Tras haber analizado los parámetros reticulocitarios en estos 3 grupos de pacientes con microcitosis, se puede afirmar que las diferencias encontradas en los hematíes

maduros de estos pacientes se encuentran también en sus precursores inmediatamente anteriores, los reticulocitos. El tamaño de los reticulocitos $\delta\beta$ es ligeramente mayor que el de los reticulocitos β y su concentración de Hb es ligeramente superior. Además, los reticulocitos $\delta\beta$ presentan un mayor grado de anisocitosis debido a la distribución heterocelular de la Hb F en ellos. El grupo que presentó un mayor porcentaje de reticulocitos inmaduros fue el grupo de pacientes con déficit de hierro, lo que probablemente refleja tanto una eritropoyesis aumentada más ineficaz que en los sujetos talasémicos, y posiblemente también una mayor expresión del ARNm del RST. Este es el primer trabajo publicado en el que se evalúan los parámetros reticulocitarios en individuos portadores de $\delta\beta$ -talasemia.

La aplicabilidad clínica de estos parámetros está aún por determinar, ya que la gran mayoría de ellos no están validados como parámetros diagnósticos dada la gran variedad de tecnologías disponibles, ni estandarizados, ni están disponibles controles clínicos comerciales para cada uno de ellos, por lo que los resultados obtenidos en este y otros trabajos similares han de ser interpretados con precaución. Sin embargo, a pesar de las mencionadas limitaciones diagnósticas, el estudio de parámetros reticulocitarios tiene un gran interés desde un punto de vista meramente teórico, ya que nos ayudan a comprender mejor la fisiopatología de estas y otras patologías eritroides.

Objetivo 4: Intentar encontrar un parámetro o combinación de parámetros del hemograma con la capacidad de predecir si un individuo es portador de una hemoglobinopatía estructural.

Con el fin de encontrar parámetros de laboratorio capaces de identificar portadores de variantes de Hb, se realizó un tercer estudio en el que se compararon 251 controles sanos con 500 portadores de hemoglobinopatía estructural. Los tipos de hemoglobinopatía estructural que se diagnosticaron fueron: 355 casos de Hb S (71%), 104 casos de Hb C (20.80%), 19 Hb D (3.80%), 7 Hb E (1.40%), 7 Hb O-Arab (1.40%), 4 variantes de cadena alfa (0.80%) y 4 Hb Lepore (0.80%).

Hasta ahora, en la mayor parte de los estudios publicados sobre hematimetría en portadores de Hb variante solamente se incluyeron casos de Hb S, otros evaluaron únicamente portadores de Hb C, y algunos compararon alguna de estas dos Hb variantes con controles sanos (*Ataúlfo González et al, 2005; Wambua et al, 2006; Guvenc et al, 2012; Liebhaber et al, 1988; Couto et al, 2003; Silva et al, 2002; Steinberg, 1975; Hinchliffe et al, 1996; Maggio et al, 1984; Sheehan et al, 1983*). Es decir, sí se han comparado los parámetros del hemograma entre portadores y no portadores, pero sólo con ciertas Hb variantes y no se ha llegado a conclusiones claras sobre el papel que uno o varios de estos parámetros podrían desempeñar en el diagnóstico de presunción de hemoglobinopatías estructurales.

Al realizar la comparación entre el grupo de portadores (de cualquier variante de Hb en estado heterocigoto) y el grupo de controles sanos, fue muy llamativo que las diferencias en todos los parámetros evaluados tuvieran una muy elevada significación estadística (tabla 1, artículo 3). Debido a que se observó un porcentaje importante de portadores de Hb variante con déficit de hierro (49.8%), probable α -talasemia asociada (30%), o ambas (19.2%), la impresión inicial fue que ambos factores (ferropenia y α -

talasemia) estaban teniendo una importante influencia en dichas diferencias. Para intentar esclarecer en qué medida estaban influyendo en estos resultados, se realizaron 3 nuevas comparaciones entre portadores y controles: eliminando los casos de Hb variante con ferropenia, eliminando sólo los que tenían una probable α -talasemia asociada, y eliminando los que tenían ferropenia y/o α -talasemia.

Cuando se analizaron sólo aquellos casos de portadores de Hb variante sin déficit de hierro ni α -talasemia hubo únicamente dos parámetros en los que no se observaron diferencias significativas (Hb y HDW). Esto pone de manifiesto que el tipo de cadena de β -globina influye en el fenotipo de los hematíes. En concreto, los hematíes de los portadores de hemoglobinopatía estructural fueron más pequeños, más densos y mostraban una mayor anisocitosis que los hematíes de controles sanos.

Se sabe que la actividad del cotransportador $K^+:Cl^-$ de los hematíes de sujetos portadores de hemoglobinopatía estructural (sobre todo de Hb S y Hb C) está aumentada debido a interacciones de la Hb variante con la membrana, produciéndose un aumento de salida de K^+ y Cl^- del hematíes que no se compensa con una mayor entrada de Na^+ o de intercambio Na^+/H^+ (Ballas *et al*, 1987). Este fenómeno es similar al que sucede en los individuos homocigotos y dobles heterocigotos (Brugnara *et al*, 1987), aunque en heterocigotos se observa en un grado menor (Ballas *et al*, 1987). De esta forma, los hematíes se deshidratan, y este aumento en su densidad se ve reflejado en una mayor CHCM cuando se les compara con controles sanos. La pérdida de agua supone también una disminución de su tamaño, reflejado en un menor VCM.

Los resultados de esta tesis están en concordancia con los pocos estudios previamente publicados que hacen referencia a este tema. Hinchliffe y colaboradores reportaron

una CHCM elevada en portadores de Hb S, Hb C y Hb D en comparación con controles normales (*Hinchliffe et al, 1996*), encontrando los valores más altos de CHCM en los individuos HbAC, seguidos por los HbAD y HbAS respectivamente (*Hinchliffe et al, 1996*). Además, varios autores han encontrado valores de VCM más bajos en portadores de Hb variantes que en sujetos sanos (*Wambua et al, 2006; Hinchliffe et al, 1996; Maggio et al, 1984; Sheehan et al, 1983*). La microcitosis encontrada en los portadores de Hb variante ha sido atribuida tanto a la coexistencia de α -talasemia como al efecto de la propia cadena mutante de Hb. Wambua y colaboradores describieron valores significativamente inferiores de VCM en sujetos HbAS comparados con sujetos HbAA independiente de si eran portadores o no de α -talasemia (*Wambua et al, 2006*). Resultados similares fueron obtenidos por Couto y colaboradores al comparar individuos HbAC y HbAA, todos ellos con los genes alfa intactos (*Couto et al, 2003*). También, en la misma línea, Silva y colaboradores postularon que la α -talasemia no contribuye de forma significativa a la microcitosis de los individuos HbAC, y que la presencia de Hb C por sí misma produce un menor VCM (*Silva et al, 2002*). En resumen, los estudios publicados hasta la fecha han demostrado que existe un grado de microcitosis ligeramente superior en portadores de hemoglobinopatía estructural respecto a controles sanos, pero la causa principal de esta microcitosis no está del todo clara, ya que tanto el estudio molecular de los genes alfa como el estudio de parámetros del metabolismo del hierro no se realizó en muchos de estos estudios (*Hinchliffe et al, 1996; Maggio et al, 1984; Sheehan et al, 1983*).

Una manera diferente de evaluar el tamaño y la densidad de los hematíes es analizar las poblaciones eritrocitarias que nos proporcionan analizadores hematológicos

basados en la difracción de luz láser, como es el caso del Advia 2120. Como era de esperar, cuando analizamos las diferencias en las poblaciones eritrocitarias, éstas mostraban la misma tendencia que los parámetros clásicos de volumen y densidad. Los hematíes de portadores de Hb variante presentaron menor %MICRO, mayor %HIPER y mayor M/H. Ni la deficiencia de hierro ni la coexistencia de α -talasemia influyeron en estas diferencias. Hasta la fecha, no se ha publicado ningún otro trabajo en el que se analicen las poblaciones eritrocitarias en portadores de hemoglobinopatía estructural.

Otro parámetro en el que se observaron diferencias significativas fue el ADE, siendo mayor en los portadores. Una posible explicación a este hecho podría ser que las interacciones entre la Hb variante y la membrana eritrocitaria no se produzcan con la misma intensidad en todos los hematíes. Esta hipotética heterogeneidad del efecto de las alteraciones en los cotransportadores de la membrana podría provocar distintos tamaños celulares dependiendo de la cantidad de agua perdida por cada hematíe, provocando así un grado de anisocitosis ligeramente mayor.

A pesar de que hay trabajos que han descrito diferencias en algunos parámetros hematológicos entre portadores de Hb variante y sujetos sanos, ninguno de estos estudios ha utilizado el hemograma como herramienta de *screening* de portadores.

En el presente trabajo, se encontraron 4 parámetros que demostraron poder discriminar entre portadores y controles normales independientemente de que tuviesen o no ferropenia o α -talasemia asociadas. Dichos parámetros fueron: VCM, ADE, %MICRO y M/H. El %MICRO fue el que presentó una mayor potencia diagnóstica, es decir la mayor ABC (0.918), seguido por el VCM (ABC 0.891), el M/H (ABC 0.877) y el ADE (ABC 0.852). Con estos cuatro parámetros se desarrolló un modelo predictivo

diagnóstico, utilizando el punto de corte para cada uno de estos parámetros con la mejor combinación de sensibilidad y especificidad. Según esto, a cada una de las muestras (casos y controles) se le asignó una puntuación final desde 0 hasta 4, dependiendo de cuántos de los siguientes criterios cumplía: VCM menor de 88.4 fl, ADE mayor de 13.4%, %MICRO mayor de 0.7% o M/H mayor de 0.8%. A continuación, se evaluó el poder diagnóstico de estos cuatro parámetros en el total de portadores y controles. Se aplicó el modelo a toda la cohorte con el fin de conseguir la mayor aplicabilidad clínica posible. Según los resultados obtenidos, una puntuación de 4, 3, 2, 1 ó 0, resultó en una probabilidad de ser portador de cualquier hemoglobinopatía estructural del 98.32%, 85.23%, 66.67%, 36.26% o 9.64% respectivamente. Se realizaron pruebas estadísticas que demostraron que este modelo estaba bien calibrado y presentaba una excelente discriminación (ABC de 0.929). Por lo tanto, parece ser una herramienta adecuada de *screening* de hemoglobinopatía estructural. Parece razonable, según estos resultados, que una puntuación de 3-4 debería conducir a investigar la posibilidad de que se trate de una Hb variante, mientras que si la puntuación es baja el diagnóstico es poco probable. El hecho de este modelo no esté estructurado como una fórmula matemática compleja, sino que es sencillo de calcular, facilita su posible aplicación en la práctica clínica diaria. El principal objetivo de este *score* es llamar la atención sobre aquellas muestras analizadas en el laboratorio en las que hay que realizar más pruebas para completar el diagnóstico de hemoglobinopatía estructural. Se trata de una estrategia sencilla, rápida y barata, que, de confirmarse su utilidad en otros estudios, podría consolidarse en el futuro como un primer paso en el diagnóstico de estas alteraciones. Un diagnóstico de presunción fiable de estas patologías puede contribuir a la racionalización del uso de recursos en el Laboratorio

de Hematología. De esta forma, los portadores pueden ser fácilmente identificados y se les puede dar un consejo genético adecuado, pero limitando el número de estudios moleculares únicamente a aquellos casos en que sea necesario. Es necesario que, en estudios futuros, se valide este *score* con analizadores hematológicos que utilicen la difracción óptica en el estudio de hematíes, tanto de la misma como de otras casas comerciales.

Objetivo 5: Estudiar las diferencias en los parámetros hematológicos de laboratorio entre sujetos portadores de Hb S heterocigota y sujetos portadores de Hb C heterocigota, y correlacionar dichas diferencias con la fisiopatología de ambas entidades.

Los resultados de este estudio revelan que la Hb S es la hemoglobinopatía estructural más frecuente en Madrid (70%), seguida por la Hb C (21%). Dado que ambas son, con gran diferencia, las dos Hb variantes más prevalentes en nuestra área geográfica, y además las de mayor relevancia clínica, es importante conocer qué parámetros las diferencian y si alguno de ellos es útil para discriminar entre ambas.

La Hb S se produce cuando una valina sustituye al ácido glutámico en la posición 6 de la cadena de β -globina, mientras que la Hb C se produce cuando el ácido glutámico de la posición 6 de la cadena de β -globina es reemplazado por una lisina (*Steinberg et al, 2009*). Ambas siguen un patrón mendeliano de herencia autosómica recesiva.

Cuando se compararon los individuos HbAS con los HbAC se observaron diferencias significativas en todos los parámetros. La misma consideración sobre la posible influencia de la ferropenia y/o α -talasemia asociadas en estas diferencias que se hizo en la comparación de portadores versus controles sanos fue hecha en este estudio. La influencia de la ferropenia pareció tener mayor impacto en estas diferencias que la coexistencia de α -talasemia, ya que varios parámetros perdieron su significación estadística cuando los casos de Hb variante y ferropenia fueron excluidos del análisis, al contrario de lo que ocurrió cuando sólo se excluyeron los casos de Hb variante y α -talasemia asociada (tabla 4, artículo 3).

Además, con el fin de evaluar el impacto exacto que tiene el tipo de cadena de β -globina en los parámetros hematológicos, se compararon los casos de Hb S y Hb C que no tenían ni ferropenia ni α -talasemia. En este caso, se observaron diferencias significativas únicamente en parámetros relacionados con el tamaño celular y la concentración de Hb (tanto índices corpusculares como poblaciones eritrocitarias). Por ejemplo, en los portadores de Hb S se encontraron valores normales de VCM (87.39 fl) mientras que los portadores de Hb C presentaron una leve microcitos (descenso del VCM) (82.62 fl, $p<0.001$), y la misma tendencia se observó en el %MICRO (1.32% vs 3.81 respectivamente, $p=0.003$). Por otro lado, los portadores de Hb C presentaron un mayor grado de hipercromía, con valores más elevados tanto de CHCM (35.68 g/dl vs 33.69 g/dl, $p<0.001$) como del %HIPER (3.65% vs 1.03%, $p=0.002$) que los portadores de Hb S. El cociente M/H fue mucho mayor en individuos HbAC (19.69 vs 4.83, $p<0.001$), algo esperable ya que el numerador del cociente (%MICRO) es mayor en este grupo mientras que el denominador (%HIPO) es menor en comparación con portadores de Hb S.

Es un hecho conocido y demostrado por varios autores que la actividad del cotransportador $K^+:Cl^-$ de los hematíes de individuos HbSS, HbCC y HbSC está aumentada en comparación a individuos HbAA, dando lugar a hematíes anormalmente densos, ya que la salida de K^+ y Cl^- no se compensa con entrada de Na^+ o intercambio Na^+/H^+ en dichos hematíes (*Ballas et al, 1987*). En el caso de sujetos heterocigotos para estas Hb variantes, HbAS y HbAC, también se ha observado este fenómeno pero con una menor intensidad (*Brugnara et al, 1987*). El fragmento N-terminal de la proteína banda 3 de la membrana del hematí posee una carga muy negativa, y se une al sitio del 2,3-DPG de la Hb (*Walder et al, 1984*). Dado que los residuos de ácido glutámico situados en las posiciones $\beta 6$ y $\beta 7$ (situados cerca del bolsillo del 2,3-DPG) son las únicas cargas negativas situadas cerca del extremo N-terminal de la cadena β (que es el que interactúa con el dominio citoplásmico de la banda 3), se ha sugerido la hipótesis de que la pérdida de una carga negativa y la adición de una o dos cargas positivas podría potenciar la unión de la cadena β de la Hb a la proteína banda 3 de la membrana (*Olivieri et al, 1992*). Esto explicaría por qué la actividad del cotransportador $K^+:Cl^-$ de los hematíes HbAS y HbAC está aumentada en comparación a otras hemoglobinopatías estructurales (*Olivieri et al, 1992*). Los hematíes HbAC son aún más densos que los hematíes HbAS, y esto podría estar motivado por una mayor actividad del cotransportador $K^+:Cl^-$ en los hematíes HbAC, ya que la lisina (el aminoácido que sustituye al glutamato en la Hb C) está más positivamente cargada que la valina (el aminoácido que sustituye al glutamato en la Hb S) y la unión de su Hb a la banda 3 estaría, por tanto, aún más aumentada.

A pesar de que se han estudiado las diferencias en parámetros hematológicos entre individuos HbAS y controles normales por un lado, y también entre individuos HbAC y

controles normales por otro, apenas existen datos en la literatura sobre las diferencias en dichos parámetros entre sujetos HbAS y HbAC. Existe únicamente un trabajo en el que se describen las diferencias entre ambas hemoglobinopatías y, en dicho estudio, el único parámetro analizado fue el VCM, que fue ligeramente inferior en los portadores de Hb C (*Sheehan et al, 1983*). En el mencionado estudio no se hace mención al posible motivo de esta leve microcitosis que presentan los individuos HbAC. Se sabe que el contenido de agua en los hematíes HbAC está disminuido por las ya mencionadas alteraciones que se producen en los cotransportadores iónicos de su membrana, y probablemente esta pérdida de agua sea mayor que la producida en los hematíes HbAS contribuyendo así a su menor tamaño.

En cuanto a la capacidad discriminatoria de los parámetros estudiados para diferenciar entre portadores de Hb S y Hb C, hubo 5 que presentaron un área bajo la curva adecuada para tal fin (se consideró que, como mínimo, debía ser de 0.7). Estos parámetros fueron el VCM, la CHCM, el %MICRO, el %HIPER y el cociente M/H. El análisis de la curva ROC mostró que el %HIPER fue el parámetro con mayor poder de discriminación entre estas dos entidades (ABC 0.842), seguido por el M/H (ABC 0.839) y la CHCM (ABC 0.833). Estos tres parámetros hacen referencia directa (%HIPER, CHCM) e indirecta (M/H) a la cromía del hematíe, demostrando así que las principales diferencias (aunque no las únicas) entre hematíes HbAS y HbAC están relacionadas con la concentración de Hb por los ya comentados cambios fisiopatológicos de estos individuos.

Coexistencia de α -talasemia

Aproximadamente un tercio de los casos de anemia falciforme o hemoglobinopatía S homocigota presentan además una α -talasemia, que se casi siempre se produce por la delección $-\alpha^{3.7}$ (Steinberg et al, 1986).

La coexistencia de α -talasemia en individuos HbSS tiene como consecuencia una disminución de la concentración de Hb S intraeritrocitaria en los hematíes maduros y una menor severidad de la anemia hemolítica de estos pacientes (Embury et al, 1982). Por tanto, dadas las implicaciones clínicas tan importantes que tiene esta asociación (modula la gravedad del cuadro clínico de los homocigotos), es muy importante poder identificar a este subgrupo de portadores. El motivo es doble: por un lado el consejo genético es diferente y podemos predecir un grado menor de severidad, y por otro lado puede ser necesario hacer no sólo pruebas diagnósticas a nivel de proteína (HPLC, electroforesis capilar) sino también estudios moleculares.

En el caso de los portadores HbAS (Ataúlfo González et al, 2005; Wambua et al, 2006; Guvenc et al, 2012) o HbAC (Liebhaber et al, 1988; Couto et al, 2003; Silva et al, 2002) que presentan además una α -talasemia, el porcentaje de Hb variante disminuye de forma significativa, y esta disminución es proporcional a la severidad de la α -talasemia (es decir, al número de genes α delecionados) (Ataúlfo González et al, 2005; Head et al, 2004; Embury et al, 1982). Este fenómeno tiene su explicación en la diferencia de cargas de las cadenas de β -globina, las cuales van a competir entre ellas para unirse a las cadenas de α -globina (cuya síntesis está disminuida) disponibles durante el ensamblaje del tetrámero de Hb. La afinidad de las cadenas β^A por las cadenas de α -globina (cargadas positivamente) es mayor que la de β^C y β^S (que presentan ganancia

de carga positiva respecto a las cadenas β^A por el cambio de aminoácido que se produce en ambas) (*Head et al, 2004; Abraham et al, 1977; Shaeffer et al, 1978*).

Además, la asociación de α -talasemia y hemoglobinopatía estructural produce una disminución del VCM y la HCM en los portadores de ambos defectos, y se observa una fuerte correlación entre el número de genes alfa deletados y el grado de microcitosis e hipocromía (*Ataúlfo González et al, 2005*). Los resultados de esta tesis en cuanto a los parámetros hematimétricos de individuos en los que estas 2 hemoglobinopatías coexisten son similares a los publicados. Se observó que, en los portadores de Hb S y α -talasemia, el recuento total de hematíes fue significativamente superior y que presentaron mayor microcitosis, hipocromía y anisocitosis (tabla 6, artículo 3). El mismo efecto se observó en aquellos portadores de Hb C que además tenían una α -talasemia, con la excepción del número total de hematíes (tabla 7, artículo 3). La novedad que presenta esta tesis respecto a trabajos previamente publicados es la inclusión de las poblaciones eritrocitarias en este análisis.

2. Temas transversales y consideraciones generales

En este último apartado de la discusión se comentan algunos asuntos relevantes que, por no tener relación directa con los objetivos fundamentales de los artículos que componen esta tesis, no han podido ser discutidos hasta ahora.

2. 1. Estrategias de cribado de hemoglobinopatías

La prevención de la aparición de hemoglobinopatías severas en el total de la población de cualquier país requiere un programa bien diseñado para establecer la epidemiología de estas patologías y para educar tanto a los profesionales sanitarios como a la población general creando conciencia del riesgo genético que supone ser portador (*Fucharoen et al, 2012*). Un programa de estas características debe tener dos pilares fundamentales. En primer lugar, ofrecer a los pacientes el mejor tratamiento posible para mejorar su calidad de vida. En segundo lugar, prevenir la aparición de nuevos casos, lo que incluye campañas informativas, *screening* de portadores, consejo genético y diagnóstico prenatal para parejas en riesgo.

Los programas de cribado tienen como objetivo la detección y el tratamiento temprano de hemoglobinopatías en la etapa presintomática, con el propósito de que ello conlleve una mejoría en el pronóstico de la afección en relación con el tratamiento efectuado después del diagnóstico habitual.

Respecto al momento de realizar el cribado, existen dos tipos fundamentales: prenatal o antenatal, y neonatal.

En varios países de la cuenca mediterránea se implantaron hace años programas de *screening* y prevención primaria, fundamentalmente para la β -talasemia homocigota (*Amato et al, 2013; Cao et al, 2013; Loukopoulos, 2011; Lena-Russo et al, 1996; Angastiniotis et al, 1981; Koren et al, 2009; Tarazi et al, 2007; Canatan et al, 2013; El-Beshlawy et al, 2009*). Gracias a estas medidas, la incidencia de esta enfermedad se ha reducido sustancialmente, siendo esta reducción de hasta el 90% en algunas áreas.

El panorama actual de las hemoglobinopatías ha cambiado drásticamente en las últimas décadas, con presencia de portadores asintomáticos en todo el mundo. Este aumento de la incidencia en zonas geográficas no endémicas se debe

fundamentalmente a la inmigración, pero no únicamente a este motivo. Los programas de prevención primaria, que habitualmente sí se llevan a cabo en las zonas endémicas de hemoglobinopatías, aún no han sido desarrollados e introducidos en los sistemas de salud de la gran mayoría de países desarrollados (*Giordano et al, 2014*).

En los últimos diez años, las hemoglobinopatías se han incluido en el programa de screening neonatal en algunos países del norte de Europa y en Estados Unidos y como experimentos piloto en algunos países africanos y sudamericanos (*Bouva et al, 2010; Hoppe, 2011; Streetly et al, 2010; Thuret et al, 2010; Bain, 2009*). Estrictamente hablando, no es imprescindible diagnosticar ni la talasemia mayor ni la anemia drepanocítica de forma urgente en el nacimiento, ya que los neonatos afectados por estas dos enfermedades permanecen asintomáticos unos meses hasta que desaparece la Hb F. A pesar de esto, gracias al diagnóstico precoz, el *screening* neonatal permite que la prevención secundaria se empiece a tiempo aproximadamente 6 meses después del nacimiento. Durante los primeros 6 meses se confirma el diagnóstico mediante el genotipo, se hace una correlación genotipo/fenotipo así como una estimación del pronóstico, y se puede escoger el mejor tratamiento de soporte que ofrecer al paciente cuando los síntomas comiencen. En ese mismo período, los padres reciben consejo en un centro especializado y pueden ser capaces de tomar decisiones respecto a un posible siguiente embarazo. El beneficio de este tipo de programas consiste en la reducción de la mortalidad de estos pacientes durante los primeros años, cuando se pueden producir complicaciones agudas fatales en pacientes aún no diagnosticados. Este beneficio obtenido lleva consigo un aumento de gasto, que ya es considerable en este tipo de pacientes y se estima que puede ser de aproximadamente 2 millones de

dólares americanos por paciente medio tratado en países desarrollados (*Koren et al, 2014*).

Por el contrario, si el cribado es prenatal, se puede hacer una prevención primaria, y las parejas en riesgo de tener un hijo con enfermedad falciforme (ambos portadores) pueden adoptar distintas medidas para evitar tener descendencia con dicha patología. Algunas de estas medidas (cambiar de pareja, no tener hijos, inseminación artificial de donantes no portadores, adopción) no son tan habituales, y la mayoría prefiere el diagnóstico genético preimplantacional e interrupción del embarazo en caso de confirmarse el diagnóstico. Por tanto, para familias que deseen evitar el nacimiento de un hijo con enfermedad el cribado antenatal es una estrategia más eficaz que el cribado neonatal, el cual es mucho menos efectivo para la prevención primaria y se centra sobre todo en la prevención secundaria.

Además del momento en que se realiza el *screening*, la pregunta principal alrededor de la cual gira todo el debate sobre el cribado de hemoglobinopatías es si dicho cribado debe hacerse sistemáticamente de forma universal o bien de forma selectiva en poblaciones de riesgo (*Panepinto et al, 2000; Joiner, 2000*). Existen argumentos a favor y en contra de ambas opciones. Entre las principales ventajas del cribado selectivo está fundamentalmente la de su menor coste. Por el contrario, el cribado universal es más costoso, aunque, si hablamos en términos de coste-efectividad, cuanto mayor sea la prevalencia de hemoglobinopatías, esta relación se va haciendo cada vez más favorable.

Una de las principales desventajas del cribado selectivo es que pueden quedarse casos sin diagnosticar, y esta pérdida de casos será mayor cuanto más elevada sea la prevalencia de la enfermedad (*Ruano Ravina et al, 2006*). Por otro lado, el hecho de

utilizar exclusivamente criterios económicos para decidir si una estrategia local de cribado debe ser universal o selectiva no es equitativo, ya que los neonatos en riesgo de las zonas de baja prevalencia tendrían una menor cobertura por el cribado de la que recibirían en un área de alta prevalencia (*Zeuner et al, 1999*).

Se estima que para una prevalencia de portadores de Hb S de, al menos, 16 por mil, no hay diferencias significativas de coste entre una estrategia de cribado universal y una estrategia de cribado selectivo (*Bencaiova et al, 2015*).

En la Unión Europea, cuatro países en los que hay una elevada prevalencia de hemoglobinopatías han adoptado una estrategia de cribado neonatal universal para detectar hemoglobinopatías estructurales (Inglaterra, Francia, Bélgica y Holanda) (*Bencaiova et al, 2015*). Portugal, en cambio, ha optado por el cribado universal antenatal.

En cuanto al cribado de hemoglobinopatías en España, desde el año 2003 se realiza un programa de cribado neonatal para detectar recién nacidos con anemia falciforme, con el fin de intentar disminuir la morbilidad de estos niños mediante la instauración de un tratamiento profiláctico con penicilina, la vacunación contra gérmenes encapsulados y el tratamiento temprano de sus complicaciones. Se asesora genéticamente a las parejas portadoras y se les ofrece un diagnóstico prenatal (*Ropero et al, 2009*).

Uno de los requisitos para realizar un programa de cribado es que la enfermedad o condición susceptible de ser cribada sea más o menos prevalente en la región geográfica o en los grupos etarios que se deseen cribar. En nuestro país hay una gran heterogeneidad en cuanto al número de inmigrantes de las diferentes comunidades autónomas, siendo Madrid, Cataluña y, en general, todo el Levante y Andalucía las

zonas con mayor prevalencia. Por el contrario, el norte y noroeste son las zonas en donde hay menos portadores de hemoglobinopatías y donde además se dan los menores aumentos (aunque también los hay) en los flujos migratorios.

González de Dios postula que parece razonable establecer en España una estrategia de cribado universal de anemia falciforme (no de talasemias u otras hemoglobinopatías) en las comunidades con prevalencia alta de población de riesgo (extranjeros de raza negra o mulatos, fundamentalmente subsaharianos), y un cribado selectivo en las comunidades con poca población de riesgo (modificable a partir de los flujos de inmigración de las comunidades autónomas) (*González de Dios, 2007*).

Dos estudios españoles realizados en comunidades con una prevalencia alta de población de riesgo, establecen conclusiones diferentes: por un lado, el estudio realizado en Cataluña (*Mañú Pereira et al, 2006*) sigue abogando por un cribado selectivo en la población de riesgo, mientras que el estudio realizado en la Comunidad de Madrid (*Joyanes et al, 2006*) apoya el cribado universal.

La contribución de esta tesis al mencionado debate consiste en la posibilidad de incorporar no sólo alguno de los índices corpusculares del hemograma para identificar posibles portadores, sino de aplicar modelos estadísticos basados en parámetros del hemograma capaces de predecir con gran fiabilidad si una muestra es portadora de un defecto de la Hb. Es decir, si estos resultados se confirman y validan en estudios futuros, se podrían sentar las bases para la implantación de una estrategia de *screening* prenatal universal de estas patologías sin ningún sobrecoste.

2.2. Epidemiología en Madrid

De forma paralela a la realización de los estudios que conforman esta tesis, en el año 2013 se llevó a cabo un pequeño estudio en el Laboratorio Central de la Comunidad de Madrid para intentar estimar la prevalencia de hemoglobinopatías estructurales en dicha comunidad autónoma (*Velasco-Rodríguez et al, 2013*). En este laboratorio se procesan muestras de 6 hospitales pertenecientes a 5 áreas de salud de la Comunidad de Madrid: área 1 [Hospital Infanta Leonor (Vallecas) y Hospital del Sureste (Arganda)], área 2 [Hospital del Henares (Coslada)], área 5 [Hospital Infanta Sofía (San Sebastián de los Reyes)], área 10 [Hospital Infanta Cristina (Parla)] y área 11 [Hospital del Tajo (Aranjuez)]. Se estudiaron todas las Hb variantes detectadas en el mencionado laboratorio entre octubre 2012 y abril 2013 gracias a la alarma proporcionada durante la determinación de Hb A_{1c} mediante HPLC. De un total de 80819 pacientes a los que se realizó determinación de Hb A_{1c} durante ese período, 159 de ellos presentaron una Hb variante, lo que arrojó una prevalencia estimada de 1,96 por mil. Cuando se analizaron los datos por áreas sanitarias, la prevalencia estimada en cada una de ellas fue de 1,56 por mil en el área 1, de 0,54 por mil en el área 2, de 2,03 por mil en el área 5, de 4,11 por mil en el área 10 y de 2,16 por mil en el área 11. De estos resultados, llama la atención la elevada prevalencia estimada en la zona de Parla y alrededores en comparación a las otras cuatro áreas sanitarias. Según datos publicados por la Conserjería de Asuntos Sociales de la Comunidad de Madrid en su informe de 2013, Parla era el municipio madrileño con un mayor porcentaje de población extranjera (un 25,87%), datos que ilustran el mencionado aumento de prevalencia de estas patologías en las últimas décadas debido a las corrientes migratorias.

2.3. Posible intervención desde el laboratorio en Atención Primaria

Los resultados de esta tesis podrían servir como punto de partida hacia una intervención proactiva del hematólogo o facultativo responsable del laboratorio orientada a Atención Primaria.

Una de las posibles estrategias que se pueden adoptar en el laboratorio para identificar portadores de hemoglobinopatía estructural consiste en incorporar a la rutina de trabajo la revisión diaria sistemática de todos los estudios de Hb A_{1c}. Esto nos permitiría, sin ningún sobre coste, identificar muestras de pacientes que presenten fracciones anormales de Hb en el cromatograma del estudio por HPLC. La mayor limitación de esta estrategia probablemente sea el hecho de que su aplicación está restringida a los pacientes diabéticos.

Al contrario que la determinación de Hb A_{1c}, el hemograma se realiza en todos los pacientes sin restricciones derivadas de la patología de base que padezcan, por lo que el *screening* de portadores basado en parámetros hematimétricos podría aplicarse de forma universal a toda la población. Un *score* predictivo como el desarrollado en este trabajo no añade coste alguno a la determinación del hemograma. Además, podría ser implementado por los fabricantes de los analizadores hematológicos para los que este modelo sea validado, de forma que se calcule automáticamente para cada muestra y se genere una alarma que el facultativo vea al validar el hemograma. De esta forma, la muestra “sospechosa” de tener una hemoglobinopatía se reservaría para realizar, en un segundo tiempo, las técnicas diagnósticas correspondientes. Una vez identificado el tipo de hemoglobinopatía, el facultativo responsable del laboratorio se pondría en contacto con el médico de Atención Primaria que pidió el hemograma, quien, a su vez,

contactaría con el paciente para derivarle a una consulta de Hematología especializada en Eritropatología, donde recibiría el consejo genético adecuado.

Esta estrategia, a pesar de no producir sobrecostes con el método de cribado de portadores, sí generaría un mayor número de estudios de hemoglobinopatía en el laboratorio de los que se realizan de forma rutinaria. Sin embargo, el consejo genético a portadores que, en la mayoría de los casos, desconocen serlo, podría disminuir de manera muy importante la aparición de homocigotos y dobles heterocigotos. Si esto se consigue, no sólo se evitarían graves problemas de salud a las personas con enfermedad sino que se podría evitar el enorme gasto en recursos sanitarios y económicos que suponen estos pacientes.

Para ello, deberían realizarse estudios de coste-efectividad que definan si esta estrategia podría aplicarse en la práctica clínica diaria.

2.4. Elección de la tecnología a utilizar para la realización del hemograma

Dado que existen en el mercado varios tipos de tecnologías en el campo de los autoanalizadores hematológicos, cada una con sus puntos fuertes y también sus debilidades, es imprescindible conocer las posibilidades y limitaciones del analizador o analizadores que tengamos en nuestro laboratorio, para asegurarnos que los resultados que ofrecemos son correctos.

Existen dos tipos fundamentales de tecnología en el análisis de la serie roja que realizan los contadores hematológicos: la impedancia y la difracción óptica. El principio de impedancia en el recuento celular se basa en la detección y la medición de cambios

en la resistencia eléctrica producida por las células cuando atraviesan una apertura pequeña. Las células suspendidas en un diluyente conductor de la electricidad, como solución fisiológica, se arrastran a través de una apertura (orificio) en un tubo de vidrio. En la cámara de recuento, o ensamblaje del transductor, se aplica la corriente eléctrica de baja frecuencia entre un electrodo externo (suspendido en la dilución celular) y uno interno (alojado dentro del tubo de apertura). La resistencia eléctrica entre los dos electrodos, o la impedancia en la corriente, se produce a medida que las células atraviesan la apertura, que tiene sensores y produce pulsos de voltaje medibles. Cuanto mayor es la diferencia de potencial, mayor es el volumen de la célula.

En los sistemas de dispersión óptica (citómetros de flujo) una masa de muestra (centrada en forma hidrodinámica) se dirige por un canal de cuarzo que genera un “flujo celular” (de una en una), sobre el que impacta la luz también “centrada”. A medida que las células circulan por la “región sensora”, la luz impacta sobre ellas y se interrumpe el flujo lumínico unidireccional. La luz se dispersa en todas direcciones con ángulos de desvío relativos a las características (densidad y tamaño) del cuerpo golpeado. Se generan a su vez procesos de absorción, difracción y dispersión lumínica, que se convierten en señales eléctricas por fotoelectrodos, y en ángulos específicos. Las señales digitalizadas, son procesadas por sistemas computerizados. La dispersión frontal de luz (0°) se correlaciona con el volumen celular (tamaño), debido sobre todo a la difracción de la luz. Por otro lado, la dispersión ortogonal o lateral de la luz (90°) es consecuencia de la refracción y reflexión lumínica, provenientes de las estructuras más grandes presentes dentro de la célula (núcleo) y se correlaciona con el grado de

“complejidad” de dichas estructuras. La ventaja que aportan los métodos de difracción es la medición de la cromía de forma directa además de la forma calculada.

La tecnología de difracción óptica ha permitido incorporar al análisis hematimétrico los eritrogramas de 9 poblaciones eritrocitarias basados en el volumen y en la concentración de hemoglobina. Estos eritrogramas tienen patrones típicos de ciertas patologías eritroides que permiten un diagnóstico de presunción fiable a simple vista y, además, nos proporcionan datos numéricos de la cantidad de hematíes microcíticos, macrocíticos, hipocrómicos e hipercrómicos. Buena parte de los hallazgos de esta tesis se han basado en estas poblaciones eritrocitarias y en la aportación de las mismas al diagnóstico diferencial de hemoglobinopatías.

Aunque los analizadores hematológicos nos informan de numerosos parámetros, no todos tienen la misma utilidad. Hay que tener claro qué parámetros nos pueden ser útiles para la revisión, cuáles debemos informar al clínico y cuáles no nos aportan ninguna información relevante.

CONCLUSIONES

- 1) La hematimetría es una herramienta del laboratorio de hematología que proporciona información de gran utilidad para el diagnóstico de presunción de hemoglobinopatías.
- 2) Existen diferencias significativas tanto en los parámetros clásicos del hemograma como en las poblaciones eritrocitarias basadas en el volumen y la concentración de hemoglobina entre los portadores de delta-beta talasemia heterocigota, los portadores de beta talasemia heterocigota y pacientes con déficit de hierro, y dichas diferencias permiten explicar las diferencias en la fisiopatología de estos tres grupos de pacientes.
- 3) El ADE es el parámetro que mejor discrimina entre portadores de delta-beta talasemia y los portadores de beta talasemia, de tal forma que si un individuo con sospecha de talasemia presenta un ADE $\geq 17.35\%$ el diagnóstico más probable es delta-beta talasemia heterocigota.
- 4) Existe una fuerte correlación entre el porcentaje de Hb F y el grado de anisocitosis en los portadores de delta-beta talasemia y beta talasemia.
- 5) Las diferencias en parámetros del hemograma observadas en los hematíes maduros de portadores de delta-beta talasemia heterocigota, portadores de beta talasemia heterocigota y pacientes con déficit de hierro también se pueden observar en sus parámetros reticulocitarios y, aunque dichos parámetros no son tan útiles para discriminar entre estos grupos de pacientes, sí tienen una gran utilidad a la hora de entender mejor la fisiopatología de estas tres entidades.

- 6) Es posible realizar un diagnóstico de presunción de que un individuo sea portador de una hemoglobinopatía estructural a través de un *score* basado en cuatro parámetros del hemograma proporcionados por el analizador Advia 2120. Debe sospecharse la presencia de una variante de hemoglobina si se cumplen tres o más de los siguientes criterios: VCM <88.4 fl, ADE >13.4%, %MICRO >0.8%, M/H >0.7.
- 6) Los hematíes de sujetos portadores de Hb C son más pequeños y más densos que los hematíes de sujetos portadores de Hb S, siendo los parámetros relacionados con la concentración de hemoglobina (CHCM y %HIPER) los que mejor discriminan entre estos dos tipos de hemoglobinopatía estructural.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham EC, Huisman THJ. Differences in affinity of variant β chains for α chains: a possible explanation for the variations in the percentages of β -chain variants in heterozygotes. Hemoglobin 1: 861, 1977.
- Adekile AD, Kazanetz EG, Leonova JY, et al. Co-inheritance of Hb D-Punjab (codon 121; GAA-->CAA) and beta (0) -thalassemia (IVS-II-1;G-->A). J Pediatr Hematol Oncol 1996; 18: 151.
- Agarwal A, Guindo A, Cissoko Y, et al. Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. Blood 2000; 96: 2358.
- Amato, A, Cappabianca MP, Lerone M, et al. Carrier screening for inherited haemoglobin disorders among secondary school students and young adults in Latium, Italy. J. Commun. Genet. 2013, 2013, doi:10.1007/s12687-013-0171-z. 13.
- Anand R, Boehm CD, Kazazian HH Jr, et al. Molecular characterization of a beta zero-thalassemia resulting from a 1.4 kilobase deletion. Blood 1988 Aug; 72 (2): 636-41.
- Anfinsen CD. Principles that govern the folding of protein chains. Science 1973; 81: 223.
- Angastiniotis MA, Hadjiminias MG. Prevention of thalassaemia in Cyprus. Lancet 1981, 1, 369-371.
- Akhavan-Niaki H, Youssefi Kamangari R, Banihashemi A et al. Hematologic features of alpha thalassemia carriers. Int J Mol Cell Med. 2012 Summer; 1 (3): 162-7.
- Aslan D, Gümrük F, Gürgey A, et al. Importance of RDW value in differential diagnosis of hypochrome anemias. Am J Hematol. 2002; 69 (1): 31-33.
- Ataúlfo González F, Blázquez C, Ropero P et al. Association of hemoglobinopathy S and alpha thalassemia. Study of 45 patients. Med Clin (Barc). 2005 May 21; 124 (19): 726-9.
- Auhlehla-Scholz C, Spiegelberg R, Horst J. A beta-thalassemia mutant caused by a 300-bp deletion in the human beta-globin gene. Hum Genet 1989 Feb; 81 (3): 298-9.

- Baglioni C. The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962 Nov 15; 48: 1880-6.
- Bain, BJ. Neonatal/newborn haemoglobinopathy screening in Europe and Africa. *J. Clin. Pathol*. 2009, 62, 53–56.
- Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. *Blood Rev*. 2011; 25: 205-213.
- Bainbridge R, Higgs DR, Maude GH, Serjeant GR. Clinical presentation of homozygous sickle cell disease. *J Pediatr* 1985; 106:881.
- Ballas SK, Lerner J, Smith ED et al. The xerocytosis of Hb SC disease. *Blood*. 1987 Jan; 69 (1): 124-30.
- Ballas SK. Sickle cell anemia with few painful crises is characterized by decreased red cell deformability and increased number of dense cells. *Am J Hematol* 1991; 36:122–130.
- Ballas SK, Smith ED. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. *Blood* 1992; 79: 2154–2163.
- Bartels PC, Schoorl M, Schoorl M. Hemoglobinization and functional availability of iron for erythropoiesis in case of thalassemia and iron deficiency anemia. *Clin Lab* 2006; 52: 107–14.
- Bartolucci P, Brugnara C, Teixeira-Pinto A, et al. Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis. *Blood* 2012; 120:3136–3141.
- Beale D, Lehmann H. Abnormal haemoglobins and the genetic code. *Nature* 1965; 207:259.
- Bencaiova G, Dapoto K, Zimmermann R, et al. Red blood cell parameters in antenatal nonsickling hemoglobinopathy screening. *Int J Womens Health*. 2015 Apr 8; 7: 379-84.
- Benito A, Villegas A, Pérez Cano R, et al. β thalassaemia in south western Spain: high frequency of G→A (IVS-I-1) mutation. *Br J Haematol* 1996; 92: 336-338.

- Bookchin RM, Gallop PM. Structure of hemoglobin Alc: nature of the N-terminal beta chain blocking group. *Biochem Biophys Res Commun* 1968; 32: 86.
- Bouva MJ, Mohrmann K, Brinkman HB, et al. Implementing neonatal screening for haemoglobinopathies in the Netherlands. *J. Med. Screen.* 2010, 17, 58–65.
- Bridges KR, Barabino GD, Brugnara C, et al. A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing hydroxyurea therapy. *Blood* 1996; 88: 4701–4710.
- Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hem*, 2009, 31, 277-297
- Brugnara C, Kopin AS, Bunn HF, Tosteson DC. Regulation of cation content and cell volume in hemoglobin erythrocytes from patients with homozygous hemoglobin C disease. *J Clin Invest* 1985; 75: 1608.
- Brugnara C, Tosteson DC. Cell volume, K transport, and cell density in human erythrocytes. *Am J Physiol.* 1987 Mar; 252 (3 Pt 1): C269-76.
- Brugnara C, Zurakowski D, Di Canzio J, et al. Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. *JAMA* 1999; 281: 2225–30.
- Brugnara C, Mohandas N. Red cell indices in classification and treatment of anemias: from M. M. Wintrobe's original 1934 classification to the third millennium. *Curr Opin Hematol.* 2013 May; 20 (3): 222-30.
- Buchanan GR, Smith SJ, Holtkamp CA, et al. Bacterial infection and splenic reticuloendothelial function in children with hemoglobin SC disease. *Pediatrics* 1983; 72: 93.
- Bunn HF, Haney DN, Gabbay KH, Gallop PM. Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A1c. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 67: 103.
- Bunn HF, Gabbay KH, Gallop PM. The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science* 1978; 200: 21.
- Bunn HF, Noguchi CT, Hofrichter J, et al. Molecular and cellular pathogenesis of hemoglobin SC disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7527.

- Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspect. WB Saunders; Philadelphia; 1986.
- Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. N Engl J Med 1997; 337: 762.
- Bunn HF. The triumph of good over evil: protection by the sickle gene against malaria. Blood. 2013 Jan 3; 121 (1): 20-5.
- Buttarelli M, Pajola R, Novello E, et al. Diagnosis of iron deficiency in patients undergoing hemodialysis. Am J Clin Pathol 2010; 133: 949-954.
- Cabot A, Casado M, Barberán J, et al. Screening neonatal de drepanocitosis en el Consorci Sanitari de Mataró. Justificación y primeros resultados. An Esp Pediatr 1998; 49: 157-60.
- Calero F. Caracterización clínica y analítica de la talasemia alfa. Estudio en la población española. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 1985.
- Calero F, Villegas A, Álvarez Sala JL, Espinós D. Rasgo talasémico alfa-1: primera forma menor de la talasemia alfa diagnosticada al nacer en España. Med Clin 1987; 88: 198-201.
- Calvo-Villas JM, Zapata Ramos MF, Cuesta Tovar J et al. Prevalence of hemoglobinopathies in pregnant women in the Lanzarote health sanitary area. An Med Interna. 2006 May; 23 (5): 206-12.
- Canatan D, Aydınok Y, Kılınc Y, et al. National thalassemia prevention campaign: The Talotır project. Haematology 2013, 30, 91–92.
- Cao A, Gossens M, Pirastu M. Beta-thalassaemia mutations in mediterranean populations. Br J Haematol 1989; 71: 309-312.
- Cao A, Saba L, Galanello R, Rosatelli MC. Molecular diagnosis and carrier screening for β -thalassemia. JAMA 1997; 278: 1.273-1.277.
- Cao A, Kan YW. The prevention of thalassemia. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2013, Feb 1; 3 (2): a011775.

- Capp GL, Rigas DA, Jones RT. Evidence for a new haemoglobin chain (ζ -chain). *Nature* 1970; 288: 278-80.
- Carnley BP, Prior JF, Gilbert A, et al. The prevalence and molecular basis of hemoglobinopathies in Cambodia. *Hemoglobin* 2006; 30: 463.
- Ceylan C, Miskioglu M, Colak H, et al. Evaluation of reticulocyte parameters in iron deficiency, vitamin B(12) deficiency and beta-thalassaemia minor patients. *Int J Lab Hematol* 2007; 29: 327–34.
- Chouliaras G, Stamoulakatou A, Tsiftis G, et al. Age, beta thalassaemia trait, and iron-deficient anaemia significantly affect reticulocyte indices in pre-school children. *Eur J Pediatr* 2010; 169: 1097–104.
- Condon PI, Hayes RJ, Serjeant GR. Retinal and choroidal neovascularization in sickle cell disease. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1980; 100: 434.
- Conserjería de Asuntos Sociales de la Comunidad de Madrid. Informe de población extranjera, enero 2013.
- Conway AM, Vora AJ, Hinchliffe RF. The clinical relevance of an isolated increase in the number of circulating hyperchromic red blood cells. *J Clin Pathol* 2002; Nov 55 (11): 841-4.
- Cortellazzi LC, Teixeira SM, Borba R, et al. Reticulocyte parameters in hemoglobinopathies and iron deficiency anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003; 25: 97–102.
- Cook JD. The measurement of serum transferrin receptor. *Am J Med Sci* 1999; 318: 269–76.
- Couto FD, De Albuquerque AB, Adorno EV et al. Alpha-Thalassemia 2, 3.7 kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis. *Clin Lab Haematol*. 2003 Feb; 25 (1): 29-34.
- de las Heras Flórez S, Pérez Hernández LM. Hemoglobinopathies diagnosed at the University Hospital Nuestra Señora de Candelaria and its area of reference in Santa Cruz de Tenerife during one year. *An Med Interna* 2008 Feb; 25 (2): 61-6.

-de-la-Iglesia-Iñigo S, Carranza-Rodríguez C, Ropero P, et al. Red blood cell disorders in recently arrived African immigrants to Gran Canaria, Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2013 Feb; 107 (2): 91-7.

-De las Nieves MA, de Pablos JM, Garrido F. Alpha thalassaemia in a Southern Spanish population.(letter) *Br J Haematol* 1989; 73 (2): 282-283.

-de Lima GA, Grotto HZ. Soluble transferrin receptor and immature reticulocytes are not useful for distinguishing iron-deficiency anemia from heterozygous beta-thalassaemia. *Sao Paulo Med J* 2003; 121: 90–1.

-De Pablos JM. Hemoglobinopatías estructurales en España. *Biol Clin Hematol* 1988, 10; 5.

-Deisseroth A, Velez R, Nienhuis AW. Hemoglobin synthesis in somatic cell hybrids: independent segregation of the human alpha and beta globin genes. *Science* 1976; 191: 1262-7.

-Dikerson RE, Geis I. Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology. The Benjamin/Cummings Company Inc. Menlo Park 1983.

-d'Onofrio G, Zini G, Ricerca BM, et al. Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and beta-thalassemia trait. *Arch Pathol Lab Med*. 1992; 116: 84-89.

-d'Onofrio G, Chirillo R, Zini G, et al. Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocítica anemia. *Blood* 1995; 85: 818–23.

-Donoghue AP. Elevated RDW in δ - β thalassemia. *Pathology*. 1987; 19: 103.

-Dulín Iñíguez E, Cantalejo López MA, Cela de Julián ME et al. Early detection of sickle cell anemia and other hemoglobinopathies in neonates in the Autonomous Community of Madrid. A pilot study. *An Pediatr (Barc)*. 2003 Feb; 58 (2): 146-55.

-Díaz-Chico JC, Yang KG, Kutlar A, et al. An approximately 300 bp deletion involving part of the 5' beta-globin gene region is observed in members of a Turkish family with beta-thalassemia. *Blood* 1987 Aug; 70 (2): 583-6.

- Eaton WA, Hofrichter J. Sick cell hemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem* 1990; 40: 63.
- El-Beshlawy A, Youssry I. Prevention of hemoglobinopathies in Egypt. *Hemoglobin* 2009, 33, S14–S20.
- Eldibany MM, Totonchi KF, Joseph NJ, Rhone D. Usefulness of certain red blood cell indices in diagnosing and differentiating thalassemia trait from iron-deficiency anemia. *Am J Clin Pathol*. 1999 May; 111 (5): 676-82.
- Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB. Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem Sci*. 1992; 17: 119-123.
- Embury SH, Miller JA, Dozy AM. Two different molecular organizations accounts for the single α -globin gene of the α -thalassemia-2 genotype. *J Clin Investigation* 1980; 66: 1319.
- Embury SH, Dozy AM, Miller J et al. Concurrent sickle-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia. *N Engl J Med*. 1982 Feb 4; 306 (5): 270-4.
- England JM, Bain BJ, Fraser PM. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet* 1973; 1: 1514.
- Fabry ME, Kaul DK, Raventos-Suárez C, et al. SC erythrocytes have an abnormally high intracellular hemoglobin concentration. Pathophysiological consequences. *J Clin Invest* 1982; 70: 1315.
- Fabry ME, Benjamin L, Lawrence C, Nagel RL. An objective sign in painful crisis in sickle cell anemia: the concomitant reduction of high density red cells. *Blood* 1984; 64:559–563.
- Fei YJ, Kutlar F, Harris HF, et al. A search for anomalies in the ζ , α , β and γ globin gene arrangements in normal black, italian, turkish, and spanish newborns. *Hemoglobin* 1989; 13: 45-65.
- Fernández Valle MC, Risueño CE, Muñoz JA. Distribution of delta-beta thalassemia near the Bahía de Cádiz [in Spanish]. *Sangre (Barc)*. 1991; 36: 438.

- Flint J, Hill VS, Bowden DK et al. High frequencies of α -thalassaemia are result of natural selection by malaria. *Nature* 1986, 321; 744-750.
- Flint J, Harding RM, Boyce AJ, et al. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillier Clin Haematol* 1998, 11 (1); 1-51.
- Fodde R, Losekoot M, van den Brook MH et al. Prevalence and molecular heterogeneity of α thalassemian two tribal populations from Andhra Pradesh, India. *Am Hum Genet* 1991, 51; 43-50.
- Font Ferré LI. Estudio de las hemoglobinopatías en la zona del delta del río Ebro. *Biol Clin Hematol* 1993; 15: 87-96.
- Ford J. Red blood cell morphology. *Int J Lab Hematol* 2013; 35 (3): 351-7.
- Fosburg MT, Nathan DG. Treatment of Cooley's anemia. *Blood* 1990; 76: 435-444.
- Fritsch EF, Lawn RM, Maniatis T. Molecular cloning and characterization of the human β -like globin gene cluster. *Cell* 1980; 19: 959-972.
- Fucharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkij R et al. Prenatal and postnatal diagnoses of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. *Clin Chem* 1998; 44: 740-8.
- Fucharoen S, Winichagoon P. New updating into hemoglobinopathies. *Int J Lab Hematol*. 2012; 34 (6): 559-65.
- Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010; 5: 11.
- Garlick RL, Mazer JS, Higgins PJ, et al. Characterization of glycosylated hemoglobins. Relevance to monitoring of diabetic control and analysis of other proteins. *J Clin Invest* 1983; 71: 1062.
- Giardine B, Borg J, Viennas E et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acid Res*. 2014 Jan; 42: D1063-9.
- Gilman JG, Huisman THJ. DNA sequence variation associated with elevated fetal γ globin production. *Blood* 1985; 66: 783-7.

- Gilman JG. The 12.6 kilobase DNA deletion in Dutch beta zero-thalassaemia. *Br J Haematol* 1987 Nov; 67 (3): 369-72.
- González de Dios E. El programa de cribado neonatal de hemoglobinopatías en España a debate. *Med Clin (Barc)*. 2007; 128 (5): 197-9.
- González FA, Hojas R, Ropero P et al. Aumento de la incidencia de hemoglobinopatías estructurales y talasemias en España. *Haematologica*. 2002; 87 Supl 1: 368-72.
- González F, Ropero P. Capítulo 14: Síndrome talasémico. Madero L, Lassaletta Á, Sevilla J. *Hematología y oncología pediátricas*. 3ª ed. Ergon. 2015. Majadahonda (Madrid). p. 151-176.
- Goodman M, Szelusniak J, Koop BF et al. Globins: a case study in molecular phylogeny. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1987; 52: 875-90.
- Goodnough LT, Nemeth E and Ganz T. Detection, evaluation and management of iron-restricted eritropoiesis. *Blood* 2010; 116 (23): 4754-4761.
- Grupo de Estudio de Hemoglobinopatías y Talasemias. Datos recopilados por M. Baiget. Los síndromes talasémicos en España. Datos epidemiológicos preliminares. *Sangre* 1986; 31: 609-613.
- Guvenc B, Canataroglu A, Unsal C et al. β -Globin chain abnormalities with coexisting α -thalassemia mutations. *Arch Med Sci*. 2012 Sep 8; 8 (4): 644-9.
- Hallberg L. Iron requirements. Comments on methods and some crucial concepts in iron nutrition. *Biol Trace Elem Res*. 1992; 35: 25-45.
- Hardison RC, Chui DH, Giardine B, et al. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat*. 2002 Mar; 19 (3): 225-33.
- Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010; 5: 13.
- Head CE, Conroy M, Jarvis M et al. Some observations on the measurement of haemoglobin A2 and S percentages by high performance liquid chromatography in the presence and absence of alpha thalassaemia. *J Clin Pathol*. 2004 Mar; 57 (3): 276-80.

- Hech F, Motulsky AG, Lemire RJ, Sheppard TE. Predominance of hemoglobin Gower 1 in early human embryonic development. *Science* 1966; 152: 91-2.
- Hess JF, Schmid CW, Shen CKJ. A gradient sequence divergence in the human adult α -globin duplication unit. *Science* 1984; 226: 67.
- Higgs DR, Weatherall DJ. α -Thalassemia. In Piomelli S & Yachnin S (eds). *Current Topics in Haematology*, pp 37, New York: AR Liss 1983A.
- Higgs DR, Goodbours SEY, Lamb J, et al. α -Thalassemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature* 1983B; 306: 398-402.
- Higgs DR, Wood WG, Barton C, et al. Clinical features and molecular analysis of acquired Hb H disease. *Am J Med* 1983C; 75: 181-6.
- Higgs DR, Vickers AOM, Wilkie IM, et al. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood* 1989; 73 (5): 1081-1104.
- Higgs DR. α -Thalassemia. En Higgs DR, Weatherall DJ (eds): *Bailliere's Clinical Haematology: The Hemoglobinopathies Vol 6*. London WB Saunders 1993; 117-51.
- Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. *Lancet*. 2012; 379: 373-383.
- Higgs DR. The molecular basis of α -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3: a011718.
- Hinchliffe RF, Norcliffe D, Farrar LM et al. Mean cell haemoglobin concentration in subjects with haemoglobin C, D, E and S traits. *Clin Lab Haematol*. 1996 Dec; 18 (4): 245-8.
- Hirsch RE, Raventos-Suarez C, Olson JA, Nagel RL. Ligand state of intraerythrocytic circulating HbC crystals in homozygote CC patients. *Blood* 1985; 66: 775.
- Hoppe CC. Newborn screening for hemoglobin disorders. *Hemoglobin* 2011, 35, 556–564.
- Hoyer JD, Penz CS, Fairbanks VF, et al. Flow cytometric measurement of hemoglobin F in RBCs: diagnostic usefulness in the distinction of hereditary persistence of fetal

hemoglobin (HPFH) and hemoglobin S-hPFH from other conditions with elevated levels of hemoglobin F. *Am J Clin Pathol.* 2002; 117: 857-863.

-Huehns ER, Flynn FV, Butler EA, Baeven GH. Two new hemoglobin variants in the very young human embryo. *Nature* 1961; 189: 496-7.

-Huisman THJ, Kutlar F, Gu LH. Gamma chain abnormalities and γ -globin gene rearrangements in newborn babies of various populations. *Hemoglobin* 1991; 15: 349-79.

-Huisman THJ. The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *Baillier Clin Haematol* 1993A, 6(1); 1-30.

-Huisman TH. The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. In: *Bailliere's Clinical Haematology*, Higgs DR, Weatherall DJ (Eds), W.B. Saunders, London 1993B. p.1.

-Hunt DM, Higgs DR, Old JM, et al. Determination of alpha thalassaemia phenotypes by messenger RNA analysis. *Br J Haematol* 1980; 45: 53-64.

-Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia hemoglobin. *Nature* 1956; 178 (4537): 792-4.

-Jelinek WR, Schmid CW. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Ann Rev Biochem* 1982; 51: 813.

-Jiménez CV, Minchinela J, Ros J. New indices from the H*2 analyser improve differentiation between heterozygous β or $\delta\beta$ thalassaemia and iron-deficiency anemia. *Clin Lab Haematol.* 1995; 17: 151-155.

-Joiner CH. Universal newborn screening for haemoglobinopathies. *J Pediatr* 2000; 136: 145-6.

-Joutovsky A, Nardi M. Hemoglobin C and hemoglobin O-Arab variants can be diagnosed using the Bio-Rad Variant II high-performance liquid chromatography system without further confirmatory tests. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 435.

-Joyanes B, Moro M, Ropero P, et al. Screening of hemoglobinopathies in a cohort of newborns in Madrid. *Med Clin (Barc).* 2006 Mar 4; (8): 290-2.

- Juncá Piera J, Farré Guerrero V, Gaspar CR, et al. Hematometric values in δ - β thalassemia minor: special importance of the erythrocyte distribution in comparison with β thalassemia and iron deficiency. *Sangre (Barc)*. 1990; 35: 134-136.
- Kakar S, Hoffman FG, Storz JF, et al. Structure and reactivity of hexacoordinate hemoglobins. *Biophys Chem*. 2010 Nov; 152 (1-3): 1-14.
- Katsantoni EZ, Langeveld A, Wai AW, et al. Persistent gamma-globin expression in adult transgenic mice is mediated by HPFH-2, HPFH-3 and HPFH-6 breakpoint sequences. *Blood*. 2003; 102: 3412-3419.
- Kattamis C, Kattamis AC. Genotypes and phenotypes of β -thalassemia in mediterranean populations. *Pediatr Hematol Oncol* 1997; 14: 7-9.
- Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL. Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions: pathophysiological implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3356.
- Kazazian HH, Boehm CD. Molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia. *Blood* 1988; 72: 1.107-1.116.
- Kim HC, Friedman S, Asakura T, et al. Inclusions in red blood cells containing Hb S or Hb C. *Br J Haematol*. 1980 Apr; 44 (4): 547-54.
- Kinney TR, Friedman S, Cifuentes E, Kim HC, Schwartz E. Variations in globin synthesis in delta-beta-thalassaemia. *Br J Haematol*. 1978; 38: 15–22.
- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes by elution. *Klin Wochenschr*. 1957; 35: 637-638.
- Koren A, Zalman L, Palmor H, et al. Sickle cell anemia in northern Israel: Screening and prevention. *Isr Med Assoc J*. 2009, 11, 229–234.
- Koren A, Profeta L, Zalman L, et al. Prevention of β thalassemia in Northern Israel-A cost-benefit analysis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014 Feb 17; 6 (1): e2014012.

- Kreuels B, Kreuzberg C, Kobbe R et al. Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia and child growth. *Blood*. 2010 Jun 3; 115 (22): 4551-8.
- Krigbaum WR, Knutton SP. Prediction of the amount of secondary structure in a globular protein from its aminoacid composition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973 Oct; 70 (10): 2809-13.
- Krüchner F, Zaccariotto TR, Rosim ET, et al. Reticulocyte evaluation in alpha (+)-thalassemia. *Am J Hematol* 2006; 81: 68–70.
- Kulozik A, Kar BC, Serjeant BE, et al. α -Thalassemia in India: its interaction with sickle cell disease. *Blood* 1988; 71: 467.
- Kutlar F, Kutlar A, Huisman TH. Separation of normal and abnormal hemoglobin chains by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1986; 357:147.
- Kutlar A, Huisman TH. Detection of hemoglobinopathies. In: *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*, Hommes FA (Ed), Wiley, New York 1991. p.519.
- Lacerra G, Fioretti G, De Angioletti M, et al. $(\alpha)\alpha^{5.3}$. A novel α^+ -thalassemia deletion with the breakpoints in the α_2 -globin gene and in close proximity to an Alu family repeat between $\Psi\alpha_2$ and $\Psi\alpha_1$ -globin genes. *Blood* 1991; 78: 2740-6.
- Las Heras Manso G, Juncà Piera J, Feliu Frasnado E et al. Hemoglobinopathies and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the sub-Saharan immigrant population of the Center and South Maresme region, Catalonia, Spain. *Med Clin (Barc)*. 2008 Jun 7; 131 (1): 5-9.
- Lawrence C, Fabry ME, Nagel RL. The unique red cell heterogeneity of SC disease: crystal formation, dense reticulocytes, and unusual morphology. *Blood* 1991; 78 (8): 2104-12.

- Lena-Russo D, Erny N, Serradimigni F, et al. Genetic hemoglobin diseases. Prevention at centers for family planning and education of maternal-child protection in Marseille. *Presse Med.* 1996, 25, 151–153.
- Lesesve JF, Salignac S, Alla F, et al. Comparative evaluation of schistocyte counting by an automated method and by microscopic determination. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 739-45.
- Liebhaber SA, Cash FE, Cornfield DB. Evidence for posttranslational control of Hb C synthesis in an individual with Hb C trait and alpha-thalassemia. *Blood.* 1988 Feb; 71 (2): 502-4.
- Lindstrom TR, Ho C. Effects of anion and ligands on the tertiary structure around ligand binding site in human adult hemoglobin. *Biochemistry.* 1973 Jan 2; 12 (1): 134-9.
- López-Escribano H, Parera MM, Guix P, et al. Balearic archipelago: three islands, three beta-thalassemia population patterns. *Clin Genet* 2013 Feb; 83 (2): 175-80.
- Loukopoulos D. Haemoglobinopathies in Greece: Prevention programme over the past 35 years. *Indian J Med Res.* 2011, 134, 572–576.
- Macdonald VW, Charache S. Differences in the reaction sequences associated with drug-induced oxidation of hemoglobins E, S, A, and F. *J Lab Clin Med* 1983; 102: 762.
- Maggio A, Gagliano F, Siciliano S. Hemoglobin phenotype and mean erythrocyte volume in Sicilian people. *Acta Haematol.* 1984; 71 (3): 214.
- Malcorra JJ, Balda MI, Campo C, et al. Hemoglobinopatías y talasemias en la colonia hindú afincada en las Islas Canarias. *Sangre* 1993; 38: 342.
- Mañú-Pereira Mdel M, Maya A, Cararach V et al. Neonatal screening of hemoglobinopathies and glucose-6-phosphate dehydrogenase in Catalonia. Pilot study in anonymous not related population. *Med Clin (Barc).* 2006 Mar 4; 126 (8): 281-5.
- Mañú Pereira Mdel M, Cabot A, Martínez González A et al. Neonatal screening of hemoglobinopathies and G6PD deficiency in Catalonia (Spain). Molecular study of sicklecell disease associated with alpha thalassemia and G6PD deficiency. *Med Clin (Barc).* 2007 Jun 30; 129 (5): 161-4.

- Martín G. Hemoglobinopatías estructurales en Extremadura. *Hematology* 1998, 83 (suppl 1), 419-423.
- Martín Núñez G, Ramos Fernández de Soria R, Fernández Galán MA, et al. Campaña de detección de hemoglobinopatías y talasemias en la población escolar del norte de Extremadura. *Sangre* 1995; 40: 459-464.
- Mast A, Blinder M, Lu Q, et al. Clinical utility of the reticulocyte haemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 2002; 99: 1489–91.
- Mast AE, Blinder MA, Dietzen DJ. Reticulocyte hemoglobin content. *Am J Hematol* 2008; 83: 307–10.
- Mentzer WC Jr. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet* 1973; 1: 882.
- Miguel Sosa A, Linares García M, Miguel García A, et al. Importance of the width of the erythrocyte distribution in the presumptive diagnosis of delta-beta thalassemia minor [in Spanish]. *Sangre (Barc)*. 1990; 35: 330-331.
- Milner PF, Kraus AP, Sebes JJ, et al. Sick cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. *N Engl J Med* 1991; 325: 1476.
- Modiano G, Morpurgo G, Terrenato L, et al. Protection against malaria morbidity: near fixation of the α thalassaemia gene in Nepalese population. *Am J Hum Genet* 1991, 48; 390-397.
- Molina JR, Sanchez-Garcia J, Torres A, et al. Reticulocyte maturation parameters are reliable early predictors of hematopoietic engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Feb; 13 (2): 172-82.
- Nagel RL, Ranney D. Genetic epidemiology of structural mutations of the β -globin gene. *Seminars in Hematology* 1990; 27: 332-59.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. Fifth ed. W. H. Freeman and Company. 2008, New York.

- Nienhuis AN, Propper RD. The Thalassemias: disorders of hemoglobin synthesis. En "Hematology of infancy and childhood. Eds Nathan DG, Oski FA, 2nd ed WB Saunders Co. Philadelphia 1981; 726-9".
- Noronha JF, Grotto HZ. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in patients with iron deficiency anemia and beta-thalassemia minor. Clin Chem Lab Med 2005; 43: 195-7.
- Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. Blood 1998; 91: 288.
- Oliva Berini E, Cladera Serra A, Torrent Quetglas M. Campaña para la detección de la beta talasemia minor y prevención de la mayor en la isla de Menorca. Experiencia de diez años. Med Clin (Barc) 1998; 110: 361-364.
- Olivieri O, Vitoux D, Galacteros F et al. Hemoglobin variants and activity of the (K+Cl-) cotransport system in human erythrocytes. Blood. 1992 Feb 1; 79 (3): 793-7.
- Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, et al. Abnormal RNA processing due to the exon mutation of beta E-globin gene. Nature 1982; 300: 768.
- Orkin SH, Antonarakis SE, Loukopoulos D. Abnormal processing of beta Knossos RNA. Blood 1984; 64: 311-5.
- Ottolenghi S, Giglioni B. The deletion in a type of delta 0-beta 0-thalassaemia begins in an inverted AluI repeat. Nature 1982 Dec 23; 300 (5894): 770-1.
- Padanilam BJ, Felice AE, Huisman TH. Partial deletion of the 5' beta-globin gene region causes beta zero-thalassemia in members of an American black family. Blood 1984 Oct; 64 (4): 941-4.
- Pain RH, Robson B. Analysis of the code relating sequence to secondary structure in proteins. Nature. 1970 Jul 4; 227 (5253): 62-3.
- Panepinto JA, Magid D, Rewers MJ, et al. Universal versus targeted screening of infants for sickle cell disease: a cost-effectiveness analysis. J Pediatr 2000; 136: 201-8.
- Papadakis MN, Patrinos GP. Contribution of gene conversion in the evolution of the human beta-like globin gene family. Hum Genet 1999 Feb; 104 (2): 117-25.

- Pataryas HA, Stamatoyannopoulos G. Hemoglobins in human fetuses: evidence for adult hemoglobina production after the 11th gestational week. *Blood* 1972; 39: 688-96.
- Pauling L, Itano Ha, et al. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 1949; 109 (2835): 443.
- Pérez Sirvent M, Moreno Miralles I, Boluferx Gilabert P, et al. Molecular characterization of thalassemias in the Valencia community and its relationship with the hematological phenotype. *Sangre (Barc)* 1998 Oct; 43 (5): 392-8.
- Perutz MF. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 1970; 228: 726-34.
- Piel FB, Tatem AJ, Huang Z et al. Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. *Lancet Glob Health*. 2014 Feb; 2 (2): e80-9.
- Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med* 1991; 325: 11.
- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 1994; 330: 1639.
- Popovich BW, Rosenblatt DS, Kendall AJ, et al. Molecular characterization of an atypical beta-thalassemia caused by a large deletion in the 5' beta-globin gene region. *Am J Hum Genet* 1986 Dec; 39 (6): 797-810.
- Programa de salud pública de la Junta de Extremadura. Subunidad de errores congénitos del metabolismo. Disponible en: www.sanidaddigital.org
- Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997; 89: 1052-7.
- Ramot B, Fisher S, Remez D, et al. Haemoglobin O in an Arab Family. *Br Med J* 1960; 2: 1262.
- Randhawa ZI, Jones RT, Lie-Injo LE. Human hemoglobin Portland II (zeta 2 beta 2). Isolation and characterization of Portland hemoglobin components and their constituent globin chains. *J Biol Chem* 1984 Jun 10; 259 (11): 7325-30.

- Rehu M, Ahonen S, Punnonen K. The diagnostic accuracy of the percentage of hypochromic red blood cells (%HYPOm) and cellular hemoglobin in reticulocytes (CHr) in differentiating iron deficiency anemia and anemia of chronic diseases. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 1809–13.
- Riggs AF. The Bohr effect. *Annu Rev Physiol* 1988; 50: 181.
- Risueño C, Castro JM, Villegas A et al. Las hemoglobinopatías en la Bahía de Cádiz. *Sangre* 1995, 40; 233.
- Ropero P, González FA, Hernández A, et al. Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies and thalassemias. *Med Clin (Barc)*. 2009 Jan 24; 132 (2): 53-6.
- Ruano Ravina A, Jato Díaz M, Cerdá Mota T. Cribado neonatal de hemoglobinopatías. Una reflexión sobre su aplicación en España. *Med Clin (Barc)*. 2006; 126: 33-40.
- Ryan K, Bain BJ, Worthington D et al; British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol*. 2010 Apr; 149 (1): 35-49.
- Safo MK, Ahmed MH, Ghatge MS, et al. Hemoglobin-ligand binding: understanding Hb function and allostery on atomic level. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1814 (6): 797-809
- Sánchez J. Prevalencia de la alfa talasemia en la sangre del cordón umbilical. Estudio mediante Hb Bart y biología molecular. UCM. Facultad de Medicina. Tesis Doctoral, Madrid 1997.
- Sankaran VG, Xu J, Byron R, et al. A functional element necessary for fetal hemoglobin silencing. *N Engl J Med*. 2011; 365: 807-814.
- Schoorl M, Schoorl M, Linssen J, et al. Efficacy of advanced discriminating algorithms for screening on iron-deficiency anemia and β -thalassemia trait: a multicenter evaluation. *Am J Clin Pathol* 2012; 138: 300–4.
- Shaeffer JR, Kingston RE, McDonald MJ et al. Competition of normal beta chains and sickle haemoglobin beta chains for alpha chains as a post-translational control mechanism. *Nature*. 1978 Dec 7; 276 (5688): 631-3.

- Sheehan RG, Frenkel EP. Influence of hemoglobin phenotype on the mean erythrocyte volumen. *Acta Haematol.* 1983; 69 (4): 260-5.
- Silva NM, Soledade CS, Costa FF et al. Alpha-thalassemia does not significantly contribute to the low MCV level of Hb C trait. *Hemoglobin.* 2002 Aug; 26 (3): 305-9.
- Skarmoutsou C, Papassotiriou I, Traeger-Synodinos J, et al. Erythroid bone marrow activity and red cell hemoglobinization in iron sufficient beta-thalassemia heterozygotes as reflected by soluble transferrin receptor and reticulocyte hemoglobin in content. Correlation with genotypes and Hb A(2) levels. *Haematologica* 2003; 88: 631–6.
- Stamatoyannopoulos G, Grosveld F. Hemoglobin switching. In: Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H, editors. *The molecular basis of blood diseases.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co. P 135-182.
- Steinberg MH. Haemoglobin C/alpha thalassaemia: haematological and biosynthetic studies. *Br J Haematol.* 1975 Jul; 30 (3): 337-42.
- Steinberg MH, Embury SH. Alpha-thalassaemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood.* 1986 Nov; 68 (5): 985-90.
- Steinberg MH, Adams JG. Hemoglobin A₂: origin, evolution and aftermath. *Blood* 1991; 78: 2165-77.
- Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR et al. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management*, 2nd edn. New York: Cambridge University Press; 2009.
- Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, Chan V, Fucharoen S, et al. ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin A₂. *Int J Lab Hematol.* 2012; 34: 1-13.
- Streetly A, Clarke M, Downing M. Implementation of the newborn screening programme for sickle cell disease in England: results for 2003–2005. *J Med Screen.* 2008; 15: 9–13.

- Streetly A, Latinovic R, Henthorn J. Positive screening and carrier results for the England-wide universal newborn sickle cellscreening programme by ethnicity and area for 2005–2007. *J Clin Pathol*. 2010, 63, 626–629.
- Sudmann AA, Piehler A, Urdal P. Reticulocyte hemoglobin equivalent to detect thalassaemia and thalassemic hemoglobin variants. *Int J Lab Hematol* 2012; 34: 605–13.
- Supan F, Yutthana P, Satja S, et al. Molecular and hematological characterization of hereditary persistence of fetal hemoglobin-6/ Indian deletion –inversion Gγ(Aγ δ β)0-thalassemia and Gγ(Aγ δ β)0-thalassemia/ HbE in Thai patients. *Am J Hematol*. 2002; 71: 109–13.
- Talkington CA, Nishioka Y, Leder P. In vitro transcription of normal, mutant, and truncated mouse alpha-globin genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980. 77(12): 7132-6.
- Tarazi I, Al Najjar E, Lulu N, et al. Obligatory premarital tests for beta-thalassaemia in the Gaza Strip: Evaluation and recommendations. *Int J Lab Hematol*. 2007, 29, 111–118.
- Tefferi A, Hanson CA, Inwards DJ. How to interpret and pursue an abnormal complete blood cell count in adults. *Mayo Clin Proc* 2005; 80 (7): 923-36.
- Thein SL, Old JM, Wainscoat JS, et al. Population and genetic studies suggest a single origin for the Indian deletion beta thalassaemia. *Br J Haematol* 1984 Jun; 57 (2): 271-8.
- Thein SL. Pathophysiology of beta thalassemia—a guide to molecular therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005: 31-7.
- Thein SL. The molecular basis of β-thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013 May 1; 3 (5): a011700.
- Thuret I, Sarles J, Merono F, et al. Neonatal screening for sickle cell disease in France: evaluation of the selective process. *J Clin Pathol*. 2010, 63, 548–551.

- Trent RJ, Jones RW, Clegg JB, et al. (A gamma delta beta) thalassaemia: similarity of phenotype in four different molecular defects, including one newly described. *Br J Haematol* 1984 Jun; 57 (2): 279-89.
- Trent RJ. Diagnosis of the haemoglobinopathies. *Clin Biochem Rev* 2006; 27:27.
- Tritipsombut J, Sanchaisuriya K, Phollarp P, et al. Micromapping of thalassemia and hemoglobinopathies in different regions of northeast Thailand and Vientiane, Laos People's Democratic Republic. *Hemoglobin* 2012; 36: 47.
- Urrechaga E. Discriminant value of % microcytic/% hypochromic ratio in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46 (12): 1752–1758.
- Urrechaga E. Red blood cell microcytosis and hypochromia in the differential diagnosis of iron deficiency and β -thalassaemia trait. *Int J Lab Hematol*. 2009; 31: 528-534.
- Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and reticulocyte parameters in iron deficiency and thalassemia. *J Clin Lab Anal*. 2011A; 25: 223-228.
- Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Analysis of reticulocyte parameters on the Sysmex XE 5000 and LH 750 analyzers in the diagnosis of inefficient erythropoiesis. *Int J Lab Hematol* 2011B; 33: 37–44.
- Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. The role of automated measurement of red cell subpopulations on the Sysmex XE 5000 analyzer in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Int J Lab Hematol* 2011C; 33: 30–6.
- Urrechaga E, Aguirre U, Izquierdo S. Multivariable discriminant analysis for the differential diagnosis of microcytic anemia. *Anemia*. 2013; 2013: 457834.
- Urrechaga E, Hoffmann JJ, Izquierdo S, et al. Differential diagnosis of microcytic anemia: the role of microcytic and hypochromic erythrocytes. *Int J Lab Hematol* 2015; 37: 334–40.
- Vayá A, Carratalá A, Martínez C, et al. Haematological and clinical data in 200 cases of thalassaemia trait in eastern Spain. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1983; 25: 369-373.

- Velasco-Rodríguez D, Alonso-Domínguez JM, González-Fernández FA, et al. Demographic impact in Madrid of variant hemoglobins detected during glycosylated hemoglobin measurement. Comunicación tipo póster en el XXVIIth International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology. La Haya, mayo 2014.
- Velati C, Sampietro M, Biassoni M, Cappellini MD, Wainscoat JS, Higgs DR et al. Alpha thalassaemia in an Italian population. *Br J Haematol* 1986; 63: 497-501.
- Vichinsky E. Hemoglobin E syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007: 79.
- Vicinanza P, Catalano L, Pollio G, et al. Delta-CHr improves the identification of anemic syndromes and the evaluation of hemoglobin synthesis. *Clin Lab Haematol* 2005; 27: 217–20.
- Villegas A, Sanchez J, Sal del Rio E. α -globin genotypes in a Spanish population. *Hemoglobin* 1992; 16 (5): 427-429.
- Villegas A, Porres A, Sánchez J et al. Red blood cell phenotypes in alpha-thalassemias in the Spanish population. *Haematologica*. 1998A Feb; 83 (2): 99-103.
- Villegas A, Roperio P, Ataúlfo González F, et al. High incidence of the CD8/9 (+G) beta 0-thalassemia mutation in Spain. *Haematologica* 1998B Dec; 83 (12): 1066-8.
- Villegas A, Roperio P. Capítulo 10: Hemoglobinopatías y alteraciones de los eritrocitos. González JM, Medina JM. *Patología Molecular*. Mc Graw-Hill. Interamericana. 2001A, Aravaca (Madrid). p. 171-192.
- Villegas A, Roperio P, González FA, et al. The thalassemia syndromes: molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin* 2001B Aug; 25 (3): 273-83.
- Voet D, Voet JG. *Hemoglobin: Protein Function in Microcosm*, Chapter 9. John Wiley & Sons (Edits); New York 1990; 210-243.
- Wagner SC, Grando AC, de Castro SM. Reticulocytes indices in β thalassemia trait individuals. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011; 33: 396–7.

- Wambua S, Mwacharo J, Uyoga S et al. Co-inheritance of alpha+-thalassaemia and sickle trait results in specific effects on haematological parameters. *Br J Haematol* 2006 Apr; 133 (2): 206-9.
- Wasi P, Na-Nakorn S, Suingdumrong A. Haemoglobin H disease in Thailand: a genetical study. *Nature* 1964; 204: 907-10.
- Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001; 79: 704–712.
- Weatherall, D.J. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood.* 2010 Jun 3; 115 (22): 4331-6.
- Weatherall DJ. The challenge of haemoglobinopathies in resource-poor countries. *Br J Haematol.* 2011; 154: 736–744.
- Williams TN, Weatherall DJ. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Sep 1; 2 (9): a011692.
- Winichagoon P, Svasti S, Munkongdee T et al. Rapid diagnosis of thalassemias and other hemoglobinopathies by capillary electrophoresis system. *Translational Res* 2008; 152: 178–84.
- Wintrobe MM. Classification of the anemias on the basis of differences in the size and hemoglobin content of the red corpuscles. *Proc Soc Exp Biol Med* 1930; 27: 1071-3.
- Zeuner D, Ades AE, Karnon J, et al. Antenatal and neonatal haemoglobinopathy screening in the UK: Review and economic analysis. *Health Technol Assess.* 1999; 3: 186.
- Zimmerman SA, O'Branski EE, Rosse WF, Ware RE. Hemoglobin S/O(Arab): thirteen new cases and review of the literature. *Am J Hematol* 1999; 60: 279.

**OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Apr 04, 2016

This is a License Agreement between Diego Velasco ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Oxford University Press, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3841531401223
License date	Apr 03, 2016
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	American Journal of Clinical Pathology
Licensed content title	δβ-Thalassemia Trait
Licensed content author	Diego Velasco-Rodríguez, Juan-Manuel Alonso-Domínguez, Fernando-Ataúlfo González-Fernández, Jesús Villarrubia, Paloma Ropero, Jorge Martínez-Nieto, Félix de la Fuente, Raquel Guillén, Natalia Acedo, Cristina Serí, Fernando Cava
Licensed content date	2014-10-01
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	None
Title of your work	APORTACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LABORATORIO PROPORCIONADOS POR EL ANALIZADOR HEMATOLÓGICO ADVIA 2120 AL DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATÍAS
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Jun 2016
Permissions cost	0.00 EUR
Value added tax	0.00 EUR
Total	0.00 EUR
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

**STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL
FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL**

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the

<https://s100.copyright.com/CustomAdmin/PLF.jsp?ref=ba202bdd-1d0a-43b1-a2ba-...> 04/04/2016

- sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org. Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oup.com.
7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.
8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.
10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
12. Other Terms and Conditions:

v1.4

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

**BMJ PUBLISHING GROUP LTD. LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Apr 04, 2016

This Agreement between Diego Velasco ("You") and BMJ Publishing Group Ltd. ("BMJ Publishing Group Ltd.") consists of your license details and the terms and conditions provided by BMJ Publishing Group Ltd. and Copyright Clearance Center.

License Number	3841801180556
License date	Apr 04, 2016
Licensed Content Publisher	BMJ Publishing Group Ltd.
Licensed Content Publication	Journal of Clinical Pathology
Licensed Content Title	Reticulocyte parameters of delta beta thalassaemia trait, beta thalassaemia trait and iron deficiency anaemia
Licensed Content Author	Diego Velasco-Rodríguez, Juan-Manuel Alonso-Domínguez, Fernando-Ataúlfo González-Fernández, Jesús Villarrubia, María Sopeña, Lorena Abalo, Paloma Ropero, Jorge Martínez-Nieto, Félix de la Fuente Gonzalo, Fernando Cava
Licensed Content Date	Jan 1, 2016
Licensed Content Volume Number	69
Licensed Content Issue Number	2
Volume number	69
Issue number	2
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this article
Format	Print
Portion	Figure/table/extract
Number of figure/table/extracts	4
Description of figure/table/extracts	Table 1, Figure 1, Figure 2, Figure 3
Will you be translating?	No
Circulation/distribution	12
Title of your thesis / dissertation	APORTACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LABORATORIO PROPORCIONADOS POR EL ANALIZADOR HEMATOLÓGICO ADVIA 2120 AL DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATÍAS
Expected completion date	Jun 2016
Estimated size(pages)	150
BMJ VAT number	GB674738491
Billing Type	Invoice
Billing Address	Diego Velasco Carretera de Colmenar Viejo km 9.1 Madrid, Spain 28034 Attn: Diego Velasco

<https://s100.copyright.com/App/PrintableLicenseFrame.jsp?publisherID=57&publish...> 04/04/2016

Requestor Location Diego Velasco
Carretera de Colmenar Viejo km 9.1

Madrid, Spain 28034
Attn: Diego Velasco

Billing Type Invoice

Billing Address Diego Velasco
Carretera de Colmenar Viejo km 9.1

Madrid, Spain 28034
Attn: Diego Velasco

Total 0.00 EUR

Terms and Conditions**BMJ Group Terms and Conditions for Permissions**

When you submit your order you are subject to the terms and conditions set out below. You will also have agreed to the Copyright Clearance Center's ("CCC") terms and conditions regarding billing and payment <https://s100.copyright.com/App/PaymentTermsAndConditions.jsp>. CCC are acting as the BMJ Publishing Group Limited's ("BMJ Group's") agent.

Subject to the terms set out herein, the BMJ Group hereby grants to you (the Licensee) a non-exclusive, non-transferable licence to re-use material as detailed in your request for this/those purpose(s) only and in accordance with the following conditions:

1) **Scope of Licence:** Use of the Licensed Material(s) is restricted to the ways specified by you during the order process and any additional use(s) outside of those specified in that request, require a further grant of permission.

2) **Acknowledgement:** In all cases, due acknowledgement to the original publication with permission from the BMJ Group should be stated adjacent to the reproduced Licensed Material. The format of such acknowledgement should read as follows:

"Reproduced from [publication title, author(s), volume number, page numbers, copyright notice year] with permission from BMJ Publishing Group Ltd."

3) **Third Party Material:** BMJ Group acknowledges to the best of its knowledge, it has the rights to licence your reuse of the Licensed Material, subject always to the caveat that images/diagrams, tables and other illustrative material included within, which have a separate copyright notice, are presumed as excluded from the licence. Therefore, you should ensure that the Licensed Material you are requesting is original to BMJ Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested in any way indicates that it was reprinted or adapted by BMJ Group with permission from another source, then you should seek permission from that source directly to re-use the Licensed Material, as this is outside of the licence granted herein.

4) **Altering/Modifying Material:** The text of any material for which a licence is granted may not be altered in any way without the prior express permission of the BMJ Group. Subject to Clause 3 above however, single figure adaptations do not require BMJ Group's approval; however, the adaptation should be credited as follows:

"Adapted by permission from BMJ Publishing Group Limited. [publication title, author, volume number, page numbers, copyright notice year]"

5) **Reservation of Rights:** The BMJ Group reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the licence details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment Terms and Conditions.

6) **Timing of Use:** First use of the Licensed Material must take place within 12 months of the grant of permission.

**BMJ PUBLISHING GROUP LTD. LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Apr 04, 2016

This Agreement between Diego Velasco ("You") and BMJ Publishing Group Ltd. ("BMJ Publishing Group Ltd.") consists of your license details and the terms and conditions provided by BMJ Publishing Group Ltd. and Copyright Clearance Center.

License Number	3841800965619
License date	Apr 04, 2016
Licensed Content Publisher	BMJ Publishing Group Ltd.
Licensed Content Publication	Journal of Clinical Pathology
Licensed Content Title	Laboratory parameters provided by Advia 2120 analyser identify structural haemoglobinopathy carriers and discriminate between Hb S trait and Hb C trait
Licensed Content Author	Diego Velasco-Rodríguez, Juan-Manuel Alonso-Domínguez, Fernando-Ataúlfo González-Fernández, Alfonso Muriel, Lorena Abalo, María Sopeña, Jesús Villarrubia, Paloma Ropero, María Paz Plaza, María Tenorio, Ana Jiménez-Martín, Gemma Moreno, Jorge Martínez-Nieto, Félix de la Fuente-Gonzalo, Marina Fernández-Escribano, Francisco Javier López-Jiménez, Fernando Cava
Licensed Content Date	Feb 25, 2016
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this article
Format	Print
Portion	Figure/table/extract
Number of figure/table/extracts	5
Description of figure/table/extracts	Tables 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
Will you be translating?	No
Circulation/distribution	12
Title of your thesis / dissertation	APORTACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LABORATORIO PROPORCIONADOS POR EL ANALIZADOR HEMATOLÓGICO ADVIA 2120 AL DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATÍAS
Expected completion date	Jun 2016
Estimated size(pages)	150
BMJ VAT number	GB674738491
Billing Type	Invoice
Billing Address	Diego Velasco Carretera de Colmenar Viejo km 9.1 Madrid, Spain 28034 Attn: Diego Velasco
Requestor Location	Diego Velasco Carretera de Colmenar Viejo km 9.1

<https://s100.copyright.com/App/PrintableLicenseFrame.jsp?publisherID=57&publish...> 04/04/2016

this point other than for BMJ Group's material breach or fraudulent misrepresentation or as otherwise permitted under a statutory right. Payment must be made in accordance with CCC's Billing and Payment Terms and conditions. In the event that you breach any material condition of these terms and condition or any of CCC's Billing and Payment Terms and Conditions, the license is automatically terminated upon written notice from the BMJ Group or CCC or as otherwise provided for in CCC's Billing and Payment Terms and Conditions, where these apply. Continued use of materials where a license has been terminated, as well as any use of the Licensed Materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute intellectual property rights infringement and BMJ Group reserves the right to take any and all actions to protect its intellectual property rights in the Licensed Materials.

8. Warranties: BMJ Group makes no express or implied representations or warranties with respect to the Licensed Material and to the fullest extent permitted by law this is provided on an "as is" basis. For the avoidance of doubt BMJ Group does not warrant that the Licensed Material is accurate or fit for any particular purpose.

9. Limitation of Liability: To the fullest extent permitted by law, the BMJ Group disclaims all liability for any indirect, consequential or incidental damages (including without limitation, damages for loss of profits, information or interruption) arising out of the use or inability to use the Licensed Material or the inability to obtain additional rights to use the Licensed Material. To the fullest extent permitted by law, the maximum aggregate liability of the BMJ Group for any claims, costs, proceedings and demands for direct losses caused by BMJ Group's breaches of its obligations herein shall be limited to twice the amount paid by you to CCC for the license granted herein.

10. Indemnity: You hereby indemnify and hold harmless the BMJ Group and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims, costs, proceeding or demands arising out of your unauthorized use of the Licensed Material.

11. No Transfer of License: This license is personal to you, and may not be assigned or transferred by you without prior written consent from the BMJ Group or its authorized agent(s). BMJ Group may assign or transfer any of its rights and obligations under this Agreement, upon written notice to you.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of BMJ Group, by CCC on the BMJ Group's behalf).

13. Objection to Contrary terms: BMJ Group hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment Terms and Conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment Terms and Conditions (which to the extent they are consistent are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and BMJ Group (and CCC) and the Licensee concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment Terms and Conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: BMJ Group or CCC may, within 30 days of issuance of this license, deny the permissions described in this license at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you should you have not been able to exercise your rights in full. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice from BMJ Group or CCC will not, to the fullest extent permitted by law, alter or invalidate the denial. For the fullest extent permitted by law in no event will BMJ Group or CCC be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to BMJ Group and/or CCC for denied permissions.

15. Restrictions to the license:

15.1 Promotion: BMJ Group will not give permission to reproduce in full or in part any Licensed Material for use in the promotion of the following: